

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Bioquímica

**REGULACIÓN DE LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN EL
HÍGADO: MECANISMOS MOLECULARES Y
FISIOPATOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

CRISTINA SÁNCHEZ RAMOS

MADRID 2011

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**REGULACIÓN DE LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES EN EL
HÍGADO: MECANISMOS MOLECULARES Y
FISIOPATOLOGÍA**

Tesis presentada para optar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid

Cristina Sánchez Ramos
Licenciada en Bioquímica

Director: Dra. María Monsalve Pérez

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares



MARÍA MONSALVE PÉREZ, Científico Titular del CSIC,
SUSANA ALEMANY DE LA PEÑA, Profesor Honorario del Departamento de
Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN

Que el trabajo que presenta Doña **CRISTINA SÁNCHEZ RAMOS**, con DNI 53439568-B, titulado “Regulación de los sistemas antioxidantes en el hígado: mecanismos moleculares y fisiopatología”, ha sido realizado bajo su dirección y consideran que reúne los requisitos de originalidad y rigor metodológico necesarios para ser presentado como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 25 de Noviembre de 2011,

Director: Dra. María Monsalve Pérez
Científico Titular del CSIC

Tutor: Dra. Susana Alemany de la Peña
Profesor Honorario
Departamento Bioquímica
Universidad Autónoma de Madrid

A mis padres, a mi hermana y a Víctor

*La constancia es más
importante que la aptitud
(anónimo)*

AGRADECIMIENTOS

Cuando por el 2005 acabé Bioquímica no pensaba que acabaría escribiendo una Tesis y menos aún que tendría que resumir en unas pocas palabras lo mucho que tengo que agradecer a todo el mundo que ha contribuido a que hoy la tenga terminada. A todos los que leéis estas líneas ¡¡Mil gracias!!

En primer lugar me gustaría agradecer a mi directora de tesis, la Dra. María Monsalve, el haberme permitido formar parte de su grupo de investigación durante estos cuatro años. Gracias, por lo mucho que me has enseñado. Muchas gracias por animarme con los seminarios y por estar siempre dispuesta a resolver todas mis dudas. Gracias por tu confianza y apoyo en el camino de la Tesis..

Al Dr. Juan Sastre en Valencia y a su grupo, en especial a Alex, por enseñarme tan bien a aislar hepatocitos. Al grupo del Dr. Ramón Bartrons, por todo lo que aprendí en mi estancia en Barcelona de la isquemia-reperfusión.

A la Dra. Susana Alemany por ser mi tutor científico, por echarme una mano cuando llegué con prisas y agobiada con los plazos.

A todos mis antiguos compañeros de HULP de manera muy especial a Silvia, Tiho, Vanesa, Ale, Esther, Virginia, Gema, Alba, Laura, Teresa, Pilar, Luis, y Susana por todo su apoyo y por los buenos momentos compartidos en ese pequeño edificio que es la Unidad de Investigación.

Gracias a la unidad de genómica, a Fátima, por ayudarme con el análisis del array y a Sergio y a Alberto por estar siempre dispuestos a echarme un mano cuando la qPCR se volvía en contra mía.

A los chicos del animalario, Irene, Iría, Tamara Sandra, Fran, Sara, Gloria, Marta y muy especialmente a Vir, Bahía y Abel por ayudarme con las peticiones de procedimiento, por sacarme ratoncillos a última hora, por enseñarme a que el trabajo en el animalario no me resultara tan difícil. ¡¡¡Mil gracias por toda vuestra ayuda!!!! Gracias a Santi, por los cálculos un tanto complicados de la dieta grasa y por ayudarme siempre en todo lo que he necesitado en el animalario. A Isabel, mil gracias por tus buenos días cada vez que bajaba al animalario y por pararte siempre un ratito a charlar conmigo.

Gracias a la unidad de citometría, en especial a Raquel, por enseñarme a compensar y por ayudarme con todos mis experimentos y a la de microscopía, en especial a Elvira por tu paciencia y por estar siempre dispuesta a echarme una mano y a Antonio, por ayudarme con esos estupendos macros. Facilitáis enormemente el trabajo.

Gracias a Roisin y a Ana por enseñarme a hacer unos “cortes perfectos” y a Yoli por facilitar el trabajo en cultivos. Gracias a la gente de la cuarta planta en especial a Susana, Carmen y René.

Gracias a los que ya se han ido, a Enara y a Patricia, por ayudarme en los comienzos, a Gaby por las charlas de fotografía, a Óscar por enseñarme que el que lucha por lo que quiere, al final lo consigue. Gracias a Tarín, por acogerme tan bien cuando llegué aquí, por ser un gran guía de restaurantes y un gran organizador

de cañas. Gracias a Sonsoles y a Alf, por todos los buenos momentos compartidos entre cafés, comidas, salidas, por lo que me he reído con vosotros y por toda vuestra ayuda en el laboratorio. Alf, siempre nos quedará Torrejón.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, empezando por la gente de la tercera planta, gracias a Vanesa, Alberto, Bea, Aída y Raúl, por acogerme tan bien cuando empecé en el CNIC, por los amigos invisibles tan divertidos y esas estupendas cenas de Navidad. Vane, mil gracias también por ayudarme con la histología. Gracias a Carmen, siempre dispuesta a echarme una mano y siempre pendiente de mí, soy consciente de que te acuerdas de mi nombre. Gracias a Candelas, por ayudarme cuando me adentré en el mundo de los representantes predoctorales. Gracias a Marta, por ayudarme con todos mis papeleos, no hay hoja de gastos que se nos resista. Gracias a Íñigo!!! eres genial!!! Qué pena no haber compartido durante más tiempo laboratorio contigo, gracias por todo, por tus ánimos, por tu energía aunque fueran las mil, me siento una privilegiada por ser una de las elegidas en el Facebook ¡Qué presión! y no te olvides: “in five minutes”....

Gracias a mis compañeros de laboratorio, a Vane, por los comienzos en el CNIC por lo mucho que me he reído contigo, “por las muñecas de famosa” y por ese neceser tan estupendo, que espero que me dure mucho tiempo. A Marta, Lucía, Piedad y Tamas por los buenos momentos en la poyata por haberme reído tanto en el laboratorio, por ser tan buenos compañeros, por vuestros ánimos con la tesis y por vuestra ayuda.

Gracias “a los de Zaragoza” a Toño, por la ubicación tan estupenda para escribir la tesis, por tus sugerencias e ideas. A los primeros en llegar, a Ester, por enseñarme tan bien a hacer un “*blue native*” a Ana y a Ricardo, por estar siempre pendiente de cómo iba la tesis y a las nuevas incorporaciones: Adela, Andrés, Carmen, Conchi, y Rebeca. Chicos, con vosotros creció el laboratorio. A todos, gracias por estar siempre dispuestos a echarme una mano, y por ayudarme con el arduo mundo de la mitocondria.

Gracias a Enrique, por dejar que el cactus y yo invadiéramos el despacho, por resolver mis dudas y por enseñarme cómo va el parking, así se hace más entretenido escribir la tesis. Gracias a Jesús y Marina, con vosotros el laboratorio ya está casi completo, Jesús qué energía y qué ganas de aprender, Marina, gracias por tus “Buenos días” con una gran sonrisa.

Gracias a Antonio Isa y Lorena, chicos, no sois conscientes de todo lo que me habéis ayudado, gracias por ser tan buenos compañeros, gracias “por fumar con vosotros” por escucharme cuando estaba totalmente pre-tésica, por preocuparos por mí, por las charlas a ultimísima hora y por mostrarme todo vuestro apoyo. Antonio, si es que nuestro signo es la caña, cabezotas sí ¿y qué? Isa, no pierdas nunca la ilusión del que acaba de empezar. Lorena, queda pendiente el partido de pádel.

Gracias a Gemma, a Moni y a Bego, por esos buenos ratos en las comidas, porque a pesar de que ya no compartamos laboratorio siempre puedo contar con vosotras, chicas !!! Muchas gracias por todo!!!

Gracias a mi torrejonera favorita, Mary, eres la alegría personificada, por haberme reído tanto en nuestra aventura estilo Carlos Sainz, por hacerme sentir orgullosa “de nuestro pueblo”. A Marta, por estar

siempre muy pendiente de mí y a Juan, por poner algo de cordura, por tus buenas ideas, por todo tu apoyo y confianza, a pesar de que me toque ir “casi siempre” a por los cafés.

Gracias a Isabel, “mi súper lab manager” porque eres genial, por dejar que te incordiará en cualquier momento, por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que he necesitado, por ponerme los puntos sobre las íes, por tu amistad, por las visitas a última hora, por el chocolate, porque sé que de verdad me vas a echar de menos y porque también sé que seguiremos en contacto. ¡Mil gracias!

Mil gracias a Dani, por nuestras charlas de ciencia y de no ciencia, por obligarme a ir a las clases de inglés, porque siempre puedo contar contigo, por lo buen compañero y lo más importante lo buena gente que eres, sé que llegarás lejos. Amigo, nos seguiremos viendo.

Mil gracias a todo mi grupo de laboratorio, a los que ya no están, Fran ¡Qué buena gente eres! ¡Cuánto aprendí de ti! Nunca se me olvidará mi primera cuanti en placa si no llega a ser por ti...Gracias a Yoli, por enseñarme tan bien cuando llegué al labo. ¡Eres la organización personificada! Por nuestros buenos momentos, por saber que siempre puedo contar contigo y porque aunque soy un desastre con los emails, tú no desesperas. A Lucía, mil gracias por toda tu ayuda, no sabes lo bien que me han venido todos esos adenos. A Álvaro, por tu tranquilidad, porque eres la persona que mejor hace los WB del mundo, eres el claro ejemplo de que el aprendiz supera con creces al maestro. A Paco, por echarme una mano con la histología, ¡Qué muestras tan perfectas! A Javi, mi heavy favorito, mi gran ayuda, siempre dispuesto a aprender y siempre dispuesto a enseñarme, no sabes, cuánto he aprendido de ti. A la pequeñaja Sofí, ¡Qué buenos son esos cascos! Por tus buenas ideas, por nuestras charletas, por tu gran ayuda, por nuestro día pendiente de compras, por compartir tantas cosas ¡¡¡Qué fuerte me parece!!! Esa frase ya casi es mía. Al recién incorporado Nacho, por regalarme todos esos cafés y porque a pesar de no haber compartido poyata contigo, sé que eres un estupendo compañero. Venga va, el ordenador para ti y cuidado con el deporte. A Brigitte, por las clases gratuitas de inglés, por aprender de ti, por nuestra unión a TLS ¡Por la marsellesa! y porque espero que seas la que continúes con los hepatocitos. A Alberto y a Nieves no os preocupéis os reservo un párrafo. Chicos, sin todos vosotros esta tesis no habría sido posible Así que, ¡¡¡Millones de gracias!!!

Gracias a Fede, por enseñarme a redactar un buen *curriculum* científico, por ayudarme a dar mis primeros pasos en la ciencia, cuando aún no sabía hacia dónde dirigirme y por brindarme la oportunidad de adentrarme en el mundo, no siempre sencillo, de la bioinformática ¡Gracias!

A mi pequeña Andriu. ¡¡¡¡Good Morning!!!! Qué días tan divertidos me has hecho pasar, por todos tus post-it llenos de dibujitos japoneses, por ser la alegría del laboratorio, por toda tu ayuda, por tus clases de baile, por nuestras quedadas, ¡¡¡Por esa cenita en el japonés!!! Por seguir contando contigo siempre, por ser genial y por ser una amiga estupenda.

Gracias a Eva, por esas grandes horas en la biblioteca, por esos súper resúmenes, por la cantidad de horas de estudio que hemos compartido, por los viajes en la continental. Así, la Bioquímica era mucho más sencilla.

Gracias a Celia, eres la bondad personificada, ¡Cuánto me ayudaste cuando bajamos a la segunda planta! Por seguir viéndonos y seguir compartiendo cosas, por permitirme que te tenga un poco abandonada, por estar siempre cerca de mí, porque eres un sol.

A mi gallega preferida, Raquel, por enseñarme tanto cuando llegué al laboratorio, por lo buena compañera que has sido y lo buena amiga que eres. Gracias por ser una estupenda guía, por nuestras risas, por los buenos momentos compartidos y por tus mensajitos en el momento adecuado ¡Gracias Rachel!

Gracias a mi estupenda compañera Nieves o más bien, ¡¡Gracias Quintins!! Ya sabes que de momento estás invitada. Por ser tan buena compañera y mejor amiga, por nuestras confidencias, por nuestras risas y por tener siempre un minuto para mí, por esas Coca-Colas eternas, por las comidas maravillosas, por todo lo que he aprendido de ti, ¡Qué ha sido muchísimo! Porque creo que en estos cuatro años hemos construido una amistad maravillosa. Por esa cena en tu casa. Por tu amistad sin condiciones, por tus grandes refranes y por recordarme como se conjuga, por todas nuestras conversaciones ¡¡Por ser la que mejor hace las inmunofluorescencias del mundo!!!

A Albert, gracias, gracias y mil gracias por todo. Por ser mi mano izquierda (ya sabes que soy zurda), por ser mi gran apoyo en el laboratorio, por lo mucho que me has ayudado y por lo mucho que he aprendido de ti, por todas tus sugerencias a lo largo de estos 5 años. Por buscar siempre el lado positivo de todo. Por decirme siempre lo bueno y lo malo, es algo que te agradezco enormemente. Por compartir tantísimas horas de trabajo contigo y estar siempre dispuesto a ayudarme y a escucharme en cualquier momento. Por nuestro lema “Las cosas o se hacen bien o no se hacen” Por ser un gran científico y mejor persona, me quedo con los buenos momentos compartidos todos estos años y lo más importante me quedo con tu amistad.

A mis chicas, Merche, Marta y Carol,. Gracias por ayudarme a dar mis primeros pasos en la ciencia en el mundo HULP y por ser mis grandes cómplices. Merche, gracias por ayudarme cuando se me resistían las transferencias, gracias por esas merendolas en tu casa y la quedada en la playita. Gracias por ser tan buena amiga y por preocuparte siempre por mí. Sí, Merche ya sabes que me tienes que ayudar con la organización. Marta, mil gracias por todo, eres una gran amiga, la que mejor enseña a pipetear del mundo, por estos casi 6 años de amistad desinteresada por todo lo que he aprendido de ti de ciencia y de lo que no es ciencia, por nuestras conversaciones y quedadas, porque jamás me canso de hablar contigo, por aguantar con gran paciencia todos mis neuras. Carol, digo, Flower, Mil gracias por tu amistad durante todo este tiempo, gracias por todas nuestras quedadas y por nuestras eternas conversaciones, gracias por poder contar siempre contigo, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por los ensayos de los seminarios en inglés ¿Qué habría hecho yo sin ti y sin tus estupendos documentos perfectamente guardados? ¡¡¡Chicas, millones de gracias!!!! El futuro está claro, creo que no hace falta que os lo recuerde.

Gracias a mis grandes y eternos amigos fuera del mundo científico a Bea, David, Almu, María, Laura, Víctor, Sara, Rafa, Sofía, Tello, Isa, Tucci, Quique, Ali y Juan. Gracias por todo lo que hemos compartido tanto en el Claret como fuera, porque nos hacemos mayores y aun así seguimos estupendos. Gracias por vuestra amistad desinteresada y gracias a todos y cada uno de vosotros por estar siempre pendientes del

desarrollo de esta Tesis. Quique, gracias, además, por dejarme compartir una de las mayores aventuras que he tenido en el camino de la Tesis, el viaje a la India, por todas las anécdotas que nos quedaron de ese viaje y por aguantar estoicamente las más de 1000 fotos.

A la familia Mena-Rodríguez, por acogerme tan bien desde el primer día y dejarme formar parte de vuestra familia, siempre me habéis hecho sentir como en casa, porque sois estupendos, por todo lo que nos queda por compartir y por dejarme ser la tía Quisss.!!!Gracias de corazón!!!

A la pequeña Lucía, espero poder ayudarte en todo lo que te propongas. !!!Eres la alegría de la casa!!!!

A Javi, por escuchar atentamente, todas mis historias con los ratones, por ser un estupendísimo cuñado, por reírme tantísimo contigo, por ayudarme con el entretenido mundo de la informática, a pesar del !!!Hala, ya la he liado!!! Por todo tu apoyo y porque siempre puedo contar contigo!!!Eres genial!!!

A mi hermanita, Mónica ¿Qué decirte? que eres la mejor hermana que se pueda tener, por compartir tantísimas cosas, por ser no sólo mi hermana sino mi gran y mejor amiga, por escuchar todas mis aventuras con la Tesis y querer liberar a todos los ratones, por ser un gran ejemplo a seguir en la vida, porque te adoro y porque espero compartir toda las aventuras que trae la vida contigo.

A mis padres por ser los mejores padres del mundo, porque sin vosotros no sería la persona que hoy en día soy, por ayudarme en todo, porque sois mi ejemplo a seguir en la vida, por no dejar que abandonara la carrera cuando se me hacía cuesta arriba, porque sin ese empujón no habría llegado a dónde estoy hoy, por entender cómo es este trabajo, por dejarme tomar todas las decisiones importantes en mi vida aun sabiendo que igual me equivocaba. !!No tengo palabras para agradeceros todo lo que habéis hecho por mí !!

Gracias a Víctor, por ser mi gran apoyo, por ser la persona perfecta para mí, por la vida que hemos compartido y por todo lo que nos queda por compartir, por todo lo que me río contigo, por lo feliz que soy a tu lado, por querer compartir toda tu vida conmigo sin condiciones. Por ser la pareja perfecta, si es que no se qué más puedo decirte que no te haya dicho ya ¿Qué haría yo sin ti?

A todos y cada uno de vosotros !!!!!!!!!!!MIL GRACIAS!!!!!!!!!!!!

RESUMEN

El coactivador transcripcional PGC-1 α un regulador clave del metabolismo celular, está implicado en la inducción de los sistemas de protección frente a estrés oxidativo de origen mitocondrial. El objetivo del estudio fue conocer la relevancia fisiopatológica de PGC-1 α en la función hepática, definiendo sus mecanismos de acción a nivel molecular y valorando su implicación en la patología hepática asociada a la disfunción metabólica.

En la primera parte del estudio se identificó a la proteína TLS, como un cofactor de PGC-1 α en la regulación de la expresión de los genes que codifican las proteínas implicadas en los procesos de protección frente a estrés oxidativo de origen mitocondrial. Además, se determinó que la actividad de TLS está en general muy reducida en ausencia de PGC-1 α . Este descubrimiento tiene una especial relevancia ya que permite establecer un vínculo funcional entre la respuesta al daño genotóxico mediada por TLS y el daño oxidativo asociado al síndrome metabólico donde PGC-1 α se encuentra inactivo.

La segunda parte del estudio se centró en el problema clínico que existe en el trasplante hepático debido a la falta de donantes y a la necesidad de descartar gran parte de los hígados donados por presentar esteatosis. La esteatosis no sólo hace que aumente mucho el nivel de daño hepático tras el trasplante, sino que también hace que el hígado sea insensible a tratamientos que le protegen frente a la lesión, como es el caso del preconditionamiento isquémico que mejora la respuesta al trasplante en los hígados sanos. Nuestro trabajo muestra que la activación de PGC-1 α es un proceso fundamental que ocurre durante la respuesta del hígado a la lesión por isquemia-reperfusión y es necesaria durante el preconditionamiento isquémico, probablemente porque permite la inducción de los sistemas de protección frente a las especies reactivas de oxígeno, uno de los causantes de la lesión. También muestra que PGC-1 α está inactivo en el hígado esteatótico y que además no se induce tras el preconditionamiento isquémico, sugiriendo que la baja actividad de PGC-1 α es lo que determina la mala respuesta del hígado esteatótico al trasplante hepático. Esta observación permite proponer a PGC-1 α como diana terapéutica, cuya activación en los hígados donados, podría facilitar el uso de hígados esteatóticos en el trasplante hepático.

Este trabajo por tanto ha cumplido bien los objetivos propuestos, sirviendo para proponer a PGC-1 α como un elemento clave en la fisiopatología hepática describiendo los mecanismos implicados y abriendo nuevas vías de intervención terapéutica.

SUMMARY

The transcriptional coactivator PGC-1 α is a master regulator of oxidative metabolism and mitochondrial function that regulates the expression of genes involved in the detoxification of reactive oxygen species of mitochondrial origin. The main goal of this project was to get insight into the physiological role of PGC-1 α in the liver, identify molecular partners and characterize the regulatory circuits involved.

The first part of the study identified TLS as a functional cofactor of PGC-1 α in the regulation of antioxidant genes. Furthermore, we determined that TLS activity is to a large extent dependent on PGC-1 α . This result is particularly relevant since it suggests that there is a functional link that makes the response to genotoxic damage mediated by TLS dependent on the activity of PGC-1 α and hence on the metabolic status of the cell.

The second part of the study focused on an important clinical problem, liver transplant. The number of donor livers is insufficient to cover the needs for liver transplants, which drives the use of suboptimal livers, like those that have an important accumulation of fat (fatty liver/steatotic liver). The steatosis makes the liver more sensitive to the damage that results from the ischemia-reperfusion process (I/R) but also makes it less responsive to preconditioning protocols that normally make the livers more resistant to I/R damage. Our study shows that the activation of PGC-1 α in response to I/R is necessary to protect the liver from I/R damage and mediates the activation of protection mechanisms following the ischemic preconditioning protocol. It also suggests that the reduced activity of PGC-1 α in the steatotic liver could be responsible for its increased sensitivity to I/R damage and poor response to preconditioning protocols. These observations allow us to propose PGC-1 α as a relevant therapeutic target whose activation in the donor livers could facilitate the clinical use of steatotic livers for transplantation.

Therefore, we believe this study has adequately addressed the objectives initially proposed and it has identified PGC-1 α as a key element in hepatic physiology, providing relevant insight into the mechanisms involved and opening new therapeutic venues.

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO	7
• La cadena de transporte electrónico	7
• Generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	7
• Estrés oxidativo	9
• Patologías asociadas al estrés oxidativo.....	10
• Sistemas de protección antioxidante.....	11
PGC-1α.....	14
• Interacción de PGC-1 α con factores de transcripción	15
• Fisiología de PGC-1 α : regulación del metabolismo.....	16
• Regulación de PGC-1 α en el hígado.....	18
ROS Y EL DAÑO AL ADN	19
• TLS/ FUS.....	20
• TLS y ROS.....	21
ROS Y LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA PATOLOGÍA HEPÁTICA	21
• Mecanismos responsables de la lesión por Isquemia-Reperfusión (IR)	23
• Precondicionamiento isquémico (PCI)	24
• Mecanismos moleculares que median en el PCI	25
• Esteatosis y lesión por IR	26
OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
CULTIVOS CELULARES	33
Cultivos primarios	33
Líneas celulares	34
TRATAMIENTOS DEL MEDIO DE CULTIVO	34
PLÁSMIDOS	35
GENERACIÓN DE ADENOVIRUS	38
INFECCIÓN CON ADENOVIRUS	39
ARN	39
• Aislamiento y purificación	39
• Retrotranscripción (RT)	39
• Análisis cuantitativo de los niveles de ARNm.....	39
• Estudios de expresión génica de genoma completo con microarrays	40
PROTEÍNAS	42
• Obtención de extractos celulares totales	42
• Cuantificación e inmunodetección en soportes de membrana (Western Blot).....	43
• Inmunoprecipitación (IP)	43
• Inmunoprecipitación de cromatina (chIP).....	43
• Ensayos de interacción entre proteínas in vitro	44
TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS.....	45
ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA	46

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS	46
DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)	46
ENSAYOS DE ACTIVIDAD CATALASA Y SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).....	47
INMUNOFLUORESCENCIA	47
ISQUEMIA REPERFUSIÓN HEPÁTICA.....	48
• Anestesia.....	48
• Cirugía	48
• Grupos experimentales.....	49
• Procesamiento y análisis histológico de las muestras	49
• Inclusión de tejidos en parafina, corte en microtomo y tinción hematoxilina-eosina	50
• Inclusión de tejidos por congelación y corte en criostato	50
• Detección de células apoptóticas.....	50
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN “IN VITRO”	51
APLICACIONES INFORMÁTICAS.....	51
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
RESULTADOS	53
Capítulo I: PGC-1α regula la actividad transcripcional de TLS sobre el sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial.....	55
TLS regula la actividad transcripcional de PGC-1 α	60
TLS regula el sistema de protección frente a estrés oxidativo de origen mitocondrial	64
TLS coopera con PGC-1 α en la regulación de los genes del sistema de protección frente a estrés oxidativo en FAO	70
TLS no está implicado en la regulación de la biogénesis mitocondrial	73
TLS no es capaz de inducir el sistema de detoxificación mitocondrial de ROS en ausencia de PGC-1 α	75
La actividad transcripcional de TLS es altamente dependiente de la presencia de PGC-1 α	79
Capítulo II: PGC-1α tiene un papel protector frente a la lesión por isquemia reperfusión	88
La expresión de PGC-1 α se induce en respuesta al preconditionamiento isquémico (PCI).....	91
La ausencia de PGC-1 α agrava la lesión asociada al daño por IR.....	93
PGC-1 α participa en la regulación de los mecanismos moleculares que ocurren durante la isquemia reoxigenación en hepatocitos	104
DISCUSIÓN.....	113
Control metabólico y respuesta al daño en el ADN.....	115
PGC-1α es un mediador en el preconditionamiento isquémico.....	121
BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXO	167

CLAVE DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
Ad	Adenovirus
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosín difosfato
Akt	Proteína quinasa B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Quinasa activada por AMP
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
β -actina	<i>Beta</i> -actina
ATP	Adenosín trifosfato
Ca ²⁺	Calcio
CaMKII	Calcium calmodulin-dependent protein kinase II
Cat	Catalasa
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina (del inglés <i>chromatin immunoprecipitation</i>)
CM-H ₂ DCFDA	5-clorometil-2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester
Cn	Calcineurina
CO ₂	Dióxido de carbono
CoQ	Coenzima Q
CTE	Cadena de transporte electrónico
Cyt C	Citocromo C
CsA	Ciclosporina A
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMNQ	2,3-Dimetoxi-1-naftoquinona
EHA	Estetatosis hepática alcohólica
EHNA	Estetatosis hepática no alcohólica
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial (del inglés <i>endotelial nitric oxide synthase</i>)
ERR- α	Receptor nuclear relacionado con el receptor de estrógenos α
FAO	Línea celular de hepatoma de rata
FADH ₂	Forma reducida del dinucleótido de flavina-adenina (FAD)
FoXO	Subfamilia O de factores de transcripción de la familia <i>Forkhead</i>
FUS	Fused in sarcoma
GPX	Glutación peroxidasas
GPT	Glutamate Pyruvate Transaminase
GOT	Glutamyl Oxaloacetic Transaminase
GSH	Glutation
GSSG	Disulfuro de glutation
GST	Glutation S-transferasa
h	Horas
HA	Hemaglutinina
HE	Hígado esteatótico (hígado graso)
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HEK-293A	Células embrionarias humanas de riñón
HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia (del inglés <i>hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit</i>)
HNF-4 α	Factor nuclear de hepatocito 4 α
HRP	Peroxidasa de rábano picante (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)
IgG	Inmunoglobulina G
Io	Ionóforo
IR	Isquemia-reperfusión
IP	Inmunoprecipitación
LXR	Factor nuclear X hepático (del inglés <i>Liver X receptor alpha</i>)

MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
MEF-2	Factor activador de miocitos 2
µg	microgramo
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NADH	Forma reducida del NAD ⁺
NFAT	Factor nuclear de células T activadas (del inglés <i>nuclear factor of activated T cells</i>)
NF-κβ	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH Oxidasas
NRF	Factor de respiración nuclear (del inglés <i>Nuclear Respiratory Factor</i>)
O₂	Oxígeno molecular
O₂⁻	Anión superóxido
OH-	Anión hidroxilo
ONOO-	Peroxinitrito
OXPHOS	Sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial
p38 MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno p38
PBS	Tampón fosfato salino
PCI	Precondicionamiento isquémico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1-α
PGC-1α^{+/+}	Cepa silvestre, control de referencia
PGC-1α^{-/-}	Ratones deficientes en la proteína PGC-1α
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRC	PGC-1-related coactivator
Prx	Peroxirredoxina
PTPm	Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial
qPCR	PCR en tiempo real o cuantitativa
RS	Región rica en residuos de serina y arginina
RRM	Dominio de reconocimiento del ARN
RNS	Especies reactivas de nitrógeno (del inglés <i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>)
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFB	Suero fetal de origen bovino
shARN	ARN de interferencia con horquilla (del inglés <i>small hairpin</i> ARN)
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SIRT	Sirtuinas, familia de enzimas deacetilasas (del inglés <i>silent information regulator 2</i>)
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TFAM	Mitochondrial transcription factor A
TLS	Translocated in liposarcoma
TLS^{-/-}	Células deficientes en la expresión de TLS
TrxR	Tiorredoxina reductasa
Trx	Tiorredoxina
UCPs	Proteínas desacoplates
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WB	Inmunodetección de proteínas (del inglés <i>Western Blot</i>)

INTRODUCCIÓN

LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

● La cadena de transporte electrónico

La respiración celular es el proceso molecular mediante el cual, las células consumen O_2 y producen CO_2 . La energía liberada en este proceso se conserva en forma de equivalentes reductores en las moléculas NADH y $FADH_2$. La respiración celular tiene lugar en las mitocondrias, donde se localizan todas las enzimas y las proteínas necesarias para llevar a cabo la denominada fosforilación oxidativa (Saraste, 1999), que permite generar Adenosin trifosfato (ATP) utilizando la energía liberada del transporte electrónico a partir del NADH o del $FADH_2$ al O_2 , para generar H_2O . Este proceso está mediado por una serie de transportadores electrónicos formados por flavoproteínas, proteínas hierro-sulfuro, ubiquinonas y citocromos, que se encuentran situados en la membrana interna de la mitocondria y que actúan secuencialmente, formando lo que se conoce como, cadena de transporte electrónico (CTE). Mediante este proceso las mitocondrias pueden suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad y la supervivencia celular, actuando como auténticas centrales energéticas de la célula (Balaban et al, 2005; Krauss et al, 2005) (Fig. 1).

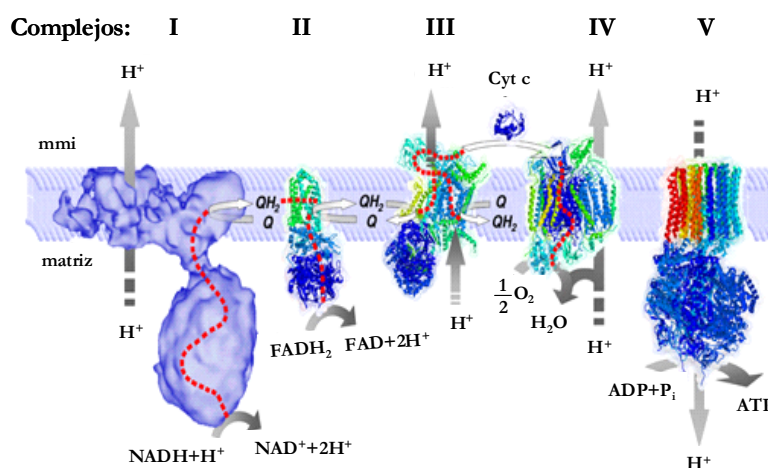


Figura 1. Cadena de transporte electrónico. Los electrones son cedidos por el NADH al complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa o NADH Deshidrogenasa) y por el $FADH_2$ al complejo II (succinato ubiquinona oxidoreductasa o succinato deshidrogenasa). A continuación, los electrones pasan a la coenzima Q (coQ) y desde allí son transferidos sucesivamente al citocromo b, que se encuentra en el complejo III ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa o citocromo bc_1), desde donde son cedidos al citocromo c_1 y posteriormente al citocromo C (Cyt C). El Cyt C reduce a su vez al citocromo a_3 en el complejo IV (citocromo oxidasa), el cual finalmente reduce el O_2 para formar H_2O . El transporte electrónico está acoplado al bombeo de protones (H^+) hacia el espacio intermembrana lo que establece un gradiente de potencial en la membrana mitocondrial interna. El flujo de H^+ de vuelta a la matriz, dirige la síntesis de ATP a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i) mediante la ATP sintasa (complejo V). Adaptado de (Nijtmans et al, 2004).

● Generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

El metabolismo mitocondrial es el responsable de la producción de la mayor parte de los ROS en la célula, debido a la generación de electrones desapareados en la CTE. Se estima que el 98% de los electrones transferidos a lo largo de la CTE están implicados en la producción de ATP, pero entorno al 1-2% de los

electrones derivados del NADH o del FADH₂ se pierden al reaccionar directamente con el oxígeno, que por tanto no se reduce por la citocromo c oxidasa, para formar H₂O, dando lugar a la generación de anión superóxido (O₂⁻) (Loschen et al, 1971; Boveris et al, 1972; Chance et al, 1979; Staniek & Nohl, 2000; St-Pierre et al, 2002). La mayor parte del O₂⁻ es eliminado, por acción de las enzimas superóxido dismutasas (SOD) en una reacción que tiene como producto el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Boveris et al, 1972; Loschen et al, 1974; Cadenas et al, 1977; Liochev & Fridovich, 2000). El H₂O₂ resulta muy tóxico para la célula, dado que en presencia de metales bivalentes reducidos, como el hierro, a través de la reacción de Fenton, da lugar al anión hidroxilo (OH⁻) que es altamente reactivo (Giulivi et al, 1995; Jang & Imlay, 2007).

Existe cierta controversia sobre la contribución a la generación de los ROS de los diferentes complejos de la CTE (St-Pierre et al, 2002; Chen et al, 2003), aunque la mayor parte de los autores está de acuerdo en que la generación de los ROS ocurre fundamentalmente en los complejos I y III de la CTE (Kushnareva et al, 2002; Liu et al, 2002; Chen et al, 2003; Turrens, 2003; Le et al, 2007; Lambert & Brand, 2009; Fedeles et al, 2011; Pramanik et al, 2011; Selivanov et al, 2011).

Los ROS se definen como moléculas portadoras de un electrón desapareado (Gutteridge & Halliwell, 2000). Son altamente reactivos, dado que tienden a robar un electrón de moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesitaba para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede, se convierte a su vez, en un nuevo radical libre, por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena (Cadenas, 2004; Valko et al, 2005).

Los ROS son moléculas con carga, lo que impide su libre difusión a través de la célula. Sin embargo, la acción del O₂⁻ generado en la mitocondria, puede extenderse por toda la célula a través del H₂O₂, que aunque estrictamente hablando, no se puede incluir dentro de los ROS, se tiende a considerar como tal, debido a su capacidad para generar HO⁻. La toxicidad de los ROS hace que la célula intente controlar su formación y su eliminación. Además, los ROS actúan como mediadores y moduladores de la señalización celular y regulan procesos biológicos relevantes como la proliferación y diferenciación celular, además de mediar en la actividad del sistema inmune (Naik & Dixit, 2011; West et al, 2011) y la homeostasis vascular, entre otros ejemplos (Elahi & Matata, 2006; Miller et al, 2006; Satoh et al, 2011; Widlansky & Gutterman, 2011). Cuando en la célula se produce un aumento anormal en los niveles de ROS se genera lo que se conoce como **estrés oxidativo**.

Los ROS pueden reaccionar también con otras moléculas, como el óxido nítrico (NO), dando lugar a las denominadas especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Brown & Borutaite, 2001) fundamentalmente, el peroxinitrito (ONOO⁻), lo que contribuye a la reducción de la biodisponibilidad del NO y causa el denominado, estrés nitrositivo (Elahi et al, 2007), que es capaz de alterar la estructura y la función de las proteínas comprometiendo la función celular (Ridnour et al, 2004). Es importante mencionar otras especies

reactivas de oxígeno como el ácido hipocloroso (HOCl) dado su abundancia y su capacidad de generar otros ROS (Stocker et al, 2004).

Estrés oxidativo

Es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de ROS y su eliminación por los sistemas de detoxificación celular (Griendling & FitzGerald, 2003; Szocs, 2004). El estrés oxidativo produce daño directo sobre todos los componente celulares, pudiendo provocar peroxidación lipídica (Ott et al, 2007; Paradies et al, 2009), oxidación de proteínas y azúcares (Stadtman, 2006), daño en el ARN y mutaciones en el ADN mitocondrial y en el ADN nuclear (Bohr, 2002; Maynard et al, 2010). Así mismo, los ROS producen un deterioro del proceso de fosforilación oxidativa y alteraciones en la señalización celular, que pueden activar los procesos apoptóticos, al provocar un aumento en la generación de mediadores proapoptóticos y al facilitar la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) (Valko et al, 2006; Lambert & Brand, 2009). Además, un exceso de ROS, también provoca alteraciones en la proliferación y la diferenciación celular y favorece la entrada en senescencia y la inmortalización celular (Shibanuma et al, 1995; Sundaresan et al, 1995; Davies, 1999; Doudican et al, 2005).

Una de las causas que puede contribuir al aumento en la producción de ROS mitocondriales es la presencia de sustancias químicas con capacidad de inhibir la actividad de alguno de los complejos de la CTE. Uno de los ejemplos mejor caracterizado es la rotenona, un inhibidor del complejo I que es utilizado como insecticida en los cultivos biológicos y que se ha asociado al desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Sherer et al, 2007).

Otro de los motivos que contribuyen a la producción de ROS, es la aparición de mutaciones en las proteínas mitocondriales. Las más frecuentes son aquellas que afectan a las proteínas codificadas por el ADN mitocondrial y que forman parte de los complejos de la CTE. Los efectos de las mutaciones son muy variados, pero es muy común observar tanto, una reducción en la producción de ATP, como, un aumento en la producción de ROS mitocondriales (Pitkanen & Robinson, 1996; Duchon, 2004; Gonzalo et al, 2005; Li et al, 2008; Birket et al, 2009).

El ADN mitocondrial es más sensible al daño oxidativo que el ADN nuclear. Se ha estimado que los ROS producen diez veces más mutaciones en el ADN mitocondrial que en el ADN nuclear (Baysal et al, 2000). La mayor vulnerabilidad a mutaciones en el ADN mitocondrial inducidas por estrés oxidativo podría deberse o bien, a que el ADN mitocondrial está más expuesto a los ROS generados en la mitocondria al carecer de las histonas protectoras, o a la menor eficiencia de los sistemas de reparación del ADN mitocondrial (Clayton et al, 1974; Yakes & Van Houten, 1997; Croteau et al, 1999).

Las alteraciones metabólicas como, la esteatosis hepática inducida por alcohol, la estosis no alcohólica, la diabetes o la obesidad, también son generadoras de una gran cantidad de ROS (Wu & Cederbaum, 2009; Serviddio et al, 2010; Yang et al, 2011).

La excesiva producción de ROS en la mitocondria representa tan sólo el primer paso de una cascada, que tiene como consecuencia, la activación secundaria de otras fuentes productoras de ROS que incluyen a la familia de las NADPH oxidasas (NOX) (Babior, 1995; Segal & Shatwell, 1997), la xantina oxido-reductasa (Scotland et al, 2001), las óxido nítrico sintasas inducibles, las lipooxigenasas y las ciclooxigenasas (Szocs, 2004; Grobe et al, 2006; Singh & Jialal, 2006; Elahi et al, 2009).

Patologías asociadas al estrés oxidativo

El estrés oxidativo afecta principalmente a aquellos tejidos que tienen una actividad metabólica elevada, como el músculo esquelético, el corazón, el hígado o el sistema nervioso central o muy expuestos a cambios en la situación metabólica, como es el caso del páncreas y del endotelio vascular, desencadenando el desarrollo de diversas patologías entre las que cabe destacar:

Enfermedades neurodegenerativas:

La enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington son enfermedades neurodegenerativas que tienen una característica común: el deterioro del metabolismo energético mitocondrial en las células (Uttara et al, 2009). En el caso de la enfermedad de Parkinson aparece de forma presintomática una reducción en la actividad del complejo I y un aumento en la producción de los ROS (Winklhofer & Haass, 2010). La etiología de la enfermedad de Alzheimer es compleja, pero está muy establecido la existencia de un componente de disfunción vascular, lo que reduce el oxígeno disponible generando en las neuronas una situación de hipoxia, que favorece la formación de ROS mitocondriales a nivel del complejo III (Carvalho et al, 2009). En la enfermedad de Huntington, la proteína mutante interacciona e inactiva reguladores claves de metabolismo oxidativo, como PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α*) lo que genera una situación de estrés oxidativo (Milakovic & Johnson, 2005; Turner & Schapira, 2010).

Ateroesclerosis:

En pacientes con ateroesclerosis, es frecuente observar la presencia de estrés oxidativo acompañado de un nivel alto de mutaciones en el ADN mitocondrial (Ballinger et al, 2002), niveles reducidos de MnSOD (Fujimoto et al, 2008), así como, alteraciones en la homeostasis mitocondrial y el potencial de membrana (Widlansky & Guterman, 2011).

Alteraciones asociadas a la diabetes:

Los niveles altos de glucosa causan estrés oxidativo mitocondrial, implicado en el desarrollo de las complicaciones asociadas a la diabetes (Giacco & Brownlee, 2010), causando entre otros, daño en las células β -pancreáticas (Brownlee, 2003), acumulación de triglicéridos en modelos animales de diabetes tipo I y II (Zhou et al, 2000b; Thandavarayan et al, 2009), retinopatía, daño renal y es un factor de riesgo para el desarrollo de la ateroesclerosis, la hipertrofia cardíaca y diversas enfermedades neurodegenerativas (Yang et al, 2011).

Envejecimiento:

Hay diversos estudios que relacionan el envejecimiento con el estrés oxidativo, una de las teorías que prevalece sostiene que, la disfunción mitocondrial y el daño al ADN mitocondrial, debido al incremento de los ROS, es determinante en el envejecimiento y en la reducción de la esperanza de vida (Harman, 1972; Trifunovic et al, 2004; Trifunovic et al, 2005; Conley et al, 2007). Los estudios más recientes que apoyan esta teoría muestran que, el envejecimiento prematuro puede ser reversible y se puede prevenir en condiciones de restricción calórica y con el ejercicio físico, promoviendo la biogénesis mitocondrial, la respiración y reduciendo los ROS mitocondriales, un proceso probablemente asociado a la actividad de PGC-1 α . Además, proponen que, la longitud telomérica y la actividad telomerasa celular está regulada por los ROS y por último, que la capacidad regenerativa y la diferenciación de células madre está muy influenciada por los ROS (Civitarese et al, 2007; Guarente, 2008; Wenz et al, 2009; Sahin et al, 2011).

Cáncer:

Está bien establecido que los ROS promueven la proliferación y están implicados en el desarrollo del tumor (Ishikawa et al, 2008; Kumar et al, 2008) aunque la contribución de los ROS mitocondriales en el desarrollo y la progresión del tumor aún permanece sin esclarecer (Chatterjee et al, 2011).

Lesión tisular por isquemia-reperfusión (IR):

La lesión por IR se produce debido a una interrupción del flujo sanguíneo con la consiguiente pérdida de acceso a nutrientes y oxígeno. Como consecuencia del restablecimiento del flujo, se produce una gran cantidad de ROS en la mitocondria lo que afecta negativamente a la viabilidad celular (Jassem & Heaton, 2004; Montalvo-Jave et al, 2008).

La relevancia de las patologías asociadas al estrés oxidativo hace necesario el estudio de los mecanismos moleculares a través de los cuales, la célula controla y regula la producción de los ROS, para facilitar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.



Sistemas de protección antioxidante

Debido a los efectos perjudiciales de los ROS, la célula ha desarrollado complejos sistemas de protección para limitar su producción y su acumulación en distintos compartimentos celulares, como son la mitocondria, la membrana plasmática, el citosol y los peroxisomas. Estos sistemas proporcionan protección frente a la toxicidad de los ROS, mediante diferentes estrategias, como, la conversión de ROS en moléculas menos reactivas, a través del proceso conocido como “*scavenging*” o mediante mecanismos que previenen la reacción de determinados ROS, para dar lugar a formas más reactivas (Powers & Lennon, 1999). Se denominará sistema de detoxificación al grupo de proteínas responsables principalmente de controlar la acumulación de los ROS de origen mitocondrial. Entre las que se incluyen:

Superóxido dismutasas (SOD)

Son las enzimas que actúan en primer lugar sobre el O_2^- derivado del metabolismo mitocondrial, catalizando su dismutación en H_2O_2 (Powers & Lennon, 1999; Oberley, 2005). En mamíferos, se han identificado tres clases de SOD. La enzima SOD1 o Cu/Zn-SOD que se localiza en el citosol, en el espacio intermembrana tiene como cofactor dos átomos metálicos, uno de Cu y otro de Zn (Crapo et al, 1992). La SOD2 o MnSOD que se localiza en la matriz mitocondrial y tiene como cofactor Mn (Wan et al, 1994). La SOD3 o Ec-SOD (extracelular) se encuentra localizada en la membrana citosólica con el sitio activo orientado hacia la matriz extracelular y tiene como cofactor al Cu o Ni (Oury et al, 1996). La falta de expresión de la enzima MnSOD se ha asociado con procesos de neurodegeneración, diabetes, miocardiopatías y elevada mortalidad neonatal (Lebovitz et al, 1996; Flekac et al, 2008; Fujimoto et al, 2008).

Catalasa (Cat)

Cataliza la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 (Goth et al, 2004; Schriener et al, 2005) previniendo la formación del radical HO^\cdot por la reacción de Fenton (Giulivi et al, 1995; Jang & Imlay, 2007). Se encuentra localizada en los peroxisomas, donde está implicada en la eliminación del H_2O_2 , procedente de la peroxidación lipídica de ácidos grasos de cadena larga. La deficiencia en la actividad de la catalasa está asociada con patologías relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer, diabetes, hipertensión y alteración en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y homocisteína (Goth et al, 2004). La sobreexpresión de la catalasa en ratones transgénicos aumenta la tolerancia en la lesión por IR y al estrés oxidativo inducido por agentes oxidantes (Ho et al, 1998; Robin et al, 2007).

Peroxirredoxinas

Es una familia de proteínas con capacidad para reducir directamente los hidroperóxidos como el H_2O_2 . En mamíferos se han descrito al menos 6 miembros con distinta localización subcelular: Prx1, Prx2 y Prx6 se localizan en el citoplasma, Prx4 en el retículo endoplásmico, Prx3 en la mitocondria y Prx5, que contiene tres isoformas generadas por *splicing* alternativo, se encuentran una, en la mitocondria, otra, en los peroxisomas y otra, en el núcleo (Cox et al, 2010). La sobreexpresión de Prx3 disminuye la acumulación de los ROS y la peroxidación lipídica haciendo que la célula sea más resistente a inductores de la apoptosis, mediada por los ROS como son la exposición al H_2O_2 , el factor de necrosis tumoral ($TNF-\alpha$) a las drogas productoras de ROS y a la hipoxia (Nonn et al, 2003; Chang et al, 2004; Chen et al, 2008). La forma mitocondrial de Prx5 previene la formación de peróxidos el daño genotóxico y la apoptosis mientras que, su deficiencia produce niveles elevados de carbonilación, daño genotóxico e hipersensibilidad al H_2O_2 , a la irradiación y a los tóxicos de origen mitocondrial (Zhou et al, 2000a; Banmeyer et al, 2004; Banmeyer et al, 2005; Kropotov et al, 2006; De Simoni et al, 2008).

Tiorredoxinas (Trx)

Las enzimas Tiorredoxina (Trx) y Tiorredoxina reductasa (TrxR), son dos enzimas oxidoreductasas. La enzima TrxR reduce a la Trx y se mantienen en estado reducido a través de una reacción dependiente de

NADPH₂ (Mustacich & Powis, 2000). Ambos tipos de enzimas tienen formas mitocondriales denominadas Trx2 y TrxR2 que actúan junto con Prx3 y Prx5 para eliminar el H₂O₂ y el O₂⁻ generado en la mitocondria por la SOD2 (Watabe et al, 1997; Gasdaska et al, 1999; Lee et al, 1999; Seo et al, 2000; Tien Nguyen-nhu & Knoops, 2003; Matsushima et al, 2006). La deficiencia a nivel cardiaco de TrxR2 produce en el ratón una cardiomiopatía similar a la observada en la ataxia de Friederich, asociada generalmente a una situación de estrés oxidativo mitocondrial (Conrad et al, 2004).

El sistema del glutatión

El glutatión (GSH) es un tripéptido con capacidad para reducir enlaces disulfuro. Los ROS son reducidos por el GSH en presencia de las glutatión peroxidasas (GPX), como resultado, el GSH se oxida a disulfuro de glutatión (GSSG) y es rápidamente reducido de nuevo a GSH por la glutatión reductasa (GR) a expensas del NADPH. La depleción de GSH ha sido asociada entre otras, a la enfermedad del alzheimer (Boyd-Kimball et al, 2005). Alteraciones en el metabolismo del glutatión son también frecuentes en distintos tipos de cáncer (Chow et al, 2007; Han & Park, 2009).

Proteínas desacoplantes (UCPs)

Las UCPs son canales protónicos de la membrana interna mitocondrial cuya función biológica es la disipación controlada del gradiente de protones. A través de estos canales, los protones pueden retornar a la matriz mitocondrial desde el espacio intermembrana, sin pasar por la ATPsintasa (Klingenberg et al, 1999), por lo que se produce un desacoplamiento entre el consumo de oxígeno y la generación de ATP (Krauss et al, 2005). Este proceso acelera la respiración y permite una mayor disipación energética en forma de calor. Dado que la producción de O₂⁻ está estrechamente relacionada con el gradiente protón-motriz generado en la CTE, se ha propuesto que el desacoplamiento de la respiración mediado por las UCPs puede reducir la producción mitocondrial de O₂⁻ y por tanto, la generación de ROS (Vidal-Puig et al, 2000; Duval et al, 2002; Echtay et al, 2002). La sobreexpresión de UCP-2, reduce la peroxidación lipídica en el cerebro (Horvath et al, 2003) y protege a las neuronas dopaminérgicas frente a agentes oxidantes inductores del Parkinson (Conti et al, 2005). UCP-2 se induce en respuesta a la acumulación de ROS y previene la lipotoxicidad que ocasiona la acumulación de ácidos grasos en la matriz (Echtay et al, 2002) que ocurre por ejemplo en pacientes con hígado graso. Además, cabe destacar que UCP-2 parece estar implicado en el desarrollo precoz de la obesidad (Wang et al, 2007).

Además de estos complejos sistemas proteínicos, existen múltiples moléculas orgánicas que participan en la defensa antioxidante, entre las que cabe destacar: el ascorbato, el piruvato, los flavonoides y los carotenoides (Finkel & Holbrook, 2000).

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio en la célula entre los niveles de producción y de eliminación de los ROS, lo que permite mantener la homeostásis celular. (Fig. 2). Sin embargo, en condiciones patológicas, este equilibrio se descompensa hacia un incremento en los niveles de ROS, que hace que se desarrollen situaciones patológicas en el organismo. Por tanto, sería de gran relevancia estudiar cuales

son los mecanismos que regulan los sistemas de detoxificación mitocondrial y los motivos por los que se pierde el equilibrio en condiciones patológicas, de esta manera, nos permitirá entender, no sólo que mecanismos median en la respuesta al estrés oxidativo, si no también, proponer nuevas estrategias terapéuticas.

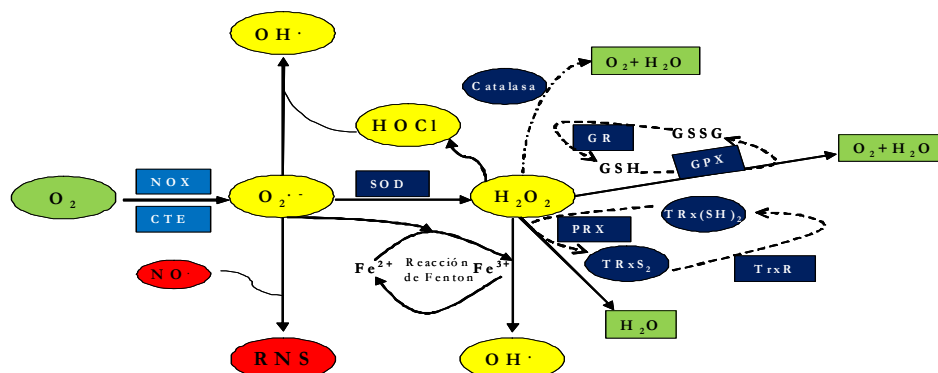


Figura 2. Producción y eliminación de ROS. El O_2^- se genera en la CTE o como resultado de la actividad de las NOX. Las células disponen de un complejo sistema de defensa para eliminar los ROS generados como consecuencia del metabolismo mitocondrial. Entre sus componentes enzimáticos se encuentran las superóxido dismutasas (SOD), la catalasa, las glutatión peroxidasas (GPx), las glutatión reductasas (GR), las peroxirredoxinas (Prx), las tioredoxinas (Trx) y tioredoxinas reductasas (TrxR). La regeneración del glutatión reducido (GSH) a través de las GR y del Trx reducido (a través de TrxR) depende del NADH. El HOCl puede reaccionar con el O_2^- para generar $OH\cdot$. El $OH\cdot$ también se puede generar a partir del H_2O_2 por la reacción de Fenton, con metales bivalentes como el Fe^{2+} . Los ROS pueden reaccionar también con otras moléculas, como el óxido nítrico (NO), dando lugar a las denominadas especies reactivas de nitrógeno (RNS). En amarillo se representan los ROS derivados de O_2 y en negro las proteínas implicadas en la detoxificación de los ROS.

PGC-1 α

Se identificó inicialmente en un ensayo de doble híbrido utilizando una librería de ADNc de células de tejido adiposo marrón, por su interacción funcional con el receptor nuclear PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) (Puigserver et al, 1998). Posteriormente, se identificaron otros dos miembros de la familia de PGC-1 que se denominaron PGC-1 β , que muestra una alta homología con PGC-1 α y PRC (*PGC-1-related coactivator*) que es el miembro menos caracterizado de la familia y el más alejado evolutivamente (Andersson & Scarpulla, 2001; Kressler et al, 2002; Lin et al, 2002a; Lin et al, 2003). (Fig.3).

PGC-1 α se ha descrito como un regulador maestro del metabolismo celular implicado en la regulación de un gran número de genes con actividad metabólica (Puigserver et al, 2003; Shin et al, 2003; Li et al, 2007; Speckmann et al, 2008). Todos los miembros de la familia PGC-1 tienen en común que su sobreexpresión induce la biogénesis mitocondrial en la célula. Están directamente implicados en la regulación de la biogénesis mitocondrial, modulando la actividad de un gran número de proteínas mitocondriales, entre las que se encuentran las proteínas que forman parte de la CTE (Puigserver et al, 1998; Wu et al, 1999; Vega et al, 2000; Scarpulla, 2002).

PGC-1 α contiene en su región N-terminal, un dominio de activación transcripcional, responsable de mediar la interacción de PGC-1 α con receptores nucleares de forma dependiente de ligando y un dominio de interacción con factores de transcripción no dependiente de ligando (Puigserver et al, 1998; Wu et al, 1999; Michael et al, 2001). En el extremo carboxilo terminal tiene una región rica en residuos de serina-arginina (dominios RS) implicado en mediar en las interacciones proteína-proteína y un dominio de reconocimiento del ARN (dominio RRM)(Monsalve et al, 2000) (Fig.3).

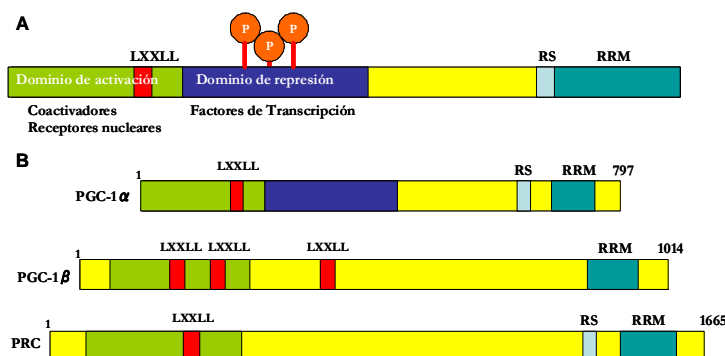


Figura 3. Dominios funcionales de la familia PGC-1. **A.** Estructura de la proteína PGC-1 α . PGC-1 α contiene un dominio de activación en la región N-terminal que interacciona con otros coactivadores transcripcionales. El motivo LXXLL es el responsable de la interacción dependiente de ligando con los receptores nucleares de hormonas. El dominio central de represión (azul) contiene sitios susceptibles de fosforilación por la p38 MAPK. La región carboxilo terminal contiene motivos de procesamiento de ARN como el dominio RS y RRM. **B.** Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia PGC-1. Adaptado de (Puigserver & Spiegelman, 2003).

Interacción de PGC-1 α con factores de transcripción

PGC-1 α es un coactivador transcripcional y como tal, no posee la capacidad de interaccionar directamente con el ADN, por lo que para regular la expresión de los genes, debe interaccionar con factores de transcripción portadores de un dominio de unión al ADN.

PGC-1 α regula la **biogénesis mitocondrial** a través de su interacción con los factores de respiración nuclear NRF-1 y NRF-2 (Wu et al, 1999) y a través de la interacción con el receptor nuclear relacionado con el receptor de estrógenos α (ERR- α) (Huss et al, 2002; Mootha et al, 2004; Schreiber et al, 2004; Wende et al, 2005; Fisher et al, 2011) incrementando la expresión de TFAM (*mitochondrial transcription factor A*), TFB1M (*mitochondrial transcription factor B1*) y TFB2M (*mitochondrial transcription factor B2*) (Larsson et al, 1997; Falkenberg et al, 2002) y los genes nucleares que codifican las proteínas mitocondriales tales como diversas proteínas del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS) (Baar et al, 2003).

PGC-1 α regula la **β -oxidación de ácidos grasos** a través de la interacción con miembros de la familia de los PPARs (α , β y δ) (Wang et al, 2003; Guan et al, 2005) y promueve la **gluconeogénesis hepática** mediante su interacción con el factor de la familia *Forkhead* FoXO1 (Puigserver et al, 2003) y con el factor nuclear de hepatocitos 4 α (HNF4 α) (Yoon et al, 2001; Rhee et al, 2003).

PGC-1 α , también regula la expresión de genes relacionados con el **sistema de detoxificación mitocondrial**, a través de la interacción con FoXO3a (Olmos et al, 2009) y ERR- α (Rangwala et al, 2007). PGC-1 α es un regulador positivo de genes relacionados con el control oxidativo mitocondrial como UCP-2, UCP-3, el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), la MnSOD, catalasa, Prx3, Prx5 y Trx2, disminuyendo los niveles intracelulares de ROS y previniendo la muerte celular por apoptosis inducida por agentes oxidantes como el H₂O₂ y la glucosa (St-Pierre et al, 2003; Valle et al, 2005; Kukidome et al, 2006; St-Pierre et al, 2006; Schulz et al, 2008b; Won et al, 2010). La expresión de PGC-1 α se induce en respuesta a agentes oxidantes como el H₂O₂ a través de un mecanismo probablemente mediado por la activación del factor de transcripción CREB (St-Pierre et al, 2006; Irrcher et al, 2009).

Además, PGC-1 α modula la secreción de lipoproteínas mediante la interacción con el receptor nuclear X hepático (LXR) (Oberkofler et al, 2003), regula la síntesis de ácido biliares y del grupo hemo (Handschin et al, 2005; Wu et al, 2009) y promueve la expresión de proteínas específicas de las fibras musculares de contracción lenta a través de la interacción con el factor activador de miocitos 2 (MEF-2) (Lin et al, 2002b; Czubryt et al, 2003; Nakagawa et al, 2009).



Fisiología de PGC-1 α : regulación del metabolismo

PGC-1 α se expresa preferentemente en tejidos con una alta demanda energética y que por tanto, presentan gran cantidad de mitocondrias, como es el caso del hígado, el corazón, el cerebro, el músculo esquelético, el tejido adiposo marrón y el riñón (Puigserver et al, 1998; Wu et al, 1999; Baar et al, 2002; Lin et al, 2003; Lin et al, 2004) y son en estos tejidos en los que más se ha estudiado la actividad de PGC-1 α .

En el **corazón**, PGC-1 α controla el proceso de biogénesis mitocondrial que se produce en el periodo perinatal (Lehman et al, 2000; Russell et al, 2004). Se ha descrito que este proceso está regulado por la proteína eNOS (*endotelial nitric oxide synthase*) de manera dependiente de calcio (Ca²⁺) (Carraway et al, 2010). Sin embargo, en el corazón de ratones adultos no se observa biogénesis mitocondrial, indicando que el periodo perinatal es el único que permite la proliferación mitocondrial inducida por PGC-1 α .

En el corazón de ratones adultos, PGC-1 α induce en respuesta al ayuno, la utilización de ácidos grasos como sustrato energético. Esta regulación está mediada por la interacción de PGC-1 α con PPAR α . Entre los genes regulados cabe destacar CD36, que regula la entrada de ácidos grasos en el cardiomiocito, CPT1b, que regula la entrada de ácidos grasos en la mitocondria, y MCAD, enzima limitante de la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena media (Burkart et al, 2007; Duncan et al, 2010). Los ratones deficientes en PGC-1 α tienen comprometida la función cardíaca, aunque no exhiben daño cardíaco y su contenido mitocondrial es normal. Sin embargo, se observa en estos ratones, una disminución en la reserva energética (Arany et al, 2005) y en la capacidad de producir ATP (Lehman et al, 2008). Los ratones deficientes tanto en PGC-1 α , como en PGC-1 β , mueren inmediatamente después de nacer como consecuencia de una disfunción cardíaca (Lai et al, 2008). Parece que la mortalidad no está asociada a alteraciones en el desarrollo,

si no a la incapacidad tras el nacimiento, de inducir un cambio metabólico que permita la utilización de ácidos grasos (Lehman et al, 2000; Buroker et al, 2008).

Existe cierta controversia sobre el papel de PGC-1 α en el fallo cardíaco. Mientras que diversos estudios en humanos sugieren que la expresión de PGC-1 α está disminuida tras el fallo cardíaco (Sebastiani et al, 2007; Garnier et al, 2009), otros estudios parecen sugerir lo contrario (Lin et al, 2004; Sihag et al, 2009). Recientemente, se ha propuesto que genes normalmente regulados por PGC-1 α , implicados en la biogénesis mitocondrial, en la glicólisis y en la β -oxidación, tienen una expresión reducida tras el fallo cardíaco, lo que parece apoyar la hipótesis de que, la actividad de PGC-1 α está disminuida tras el fallo cardíaco (Sihag et al, 2009; Karamanlidis et al, 2010). Por otro lado, hay estudios que indican que la expresión de PGC-1 α se induce por la isquemia (Arany et al, 2008; Zhu et al, 2010) y por la bajada en los niveles de ATP (Jager et al, 2007; Rohas et al, 2007) que tienen lugar durante el fallo cardíaco, apoyando la hipótesis contraria.

En el **músculo esquelético**, en respuesta al frío, PGC-1 α promueve mediante interacción con MEF-2, la formación de fibras musculares lentas (Lin et al, 2002b; Czubryt et al, 2003) a través de un mecanismo mediado por la calcineurina (cn) (Handschin et al, 2003; Schaeffer et al, 2004; Kusuhara et al, 2007) y por sensores metabólicos como la quinasa activada por AMP (AMPK) (Jager et al, 2007), que inducen la expresión de PGC-1 α en el músculo estriado (Zong et al, 2002; Czubryt et al, 2003; Handschin et al, 2003; Schaeffer et al, 2004). La expresión de PGC-1 α también parece estar regulada por el NO (Nisoli et al, 2004) y por el microARN mir696 (Aoi et al, 2010). Estudios recientes muestran que, PGC-1 α en el músculo y en respuesta a hipoxia induce la expresión del factor angiogénico, VEGF (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) a través de su interacción con ERR- α y de forma independiente de HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit*) (Arany et al, 2008). PGC-1 α también parece incrementar la capacidad antioxidante en el músculo esquelético, mediante la regulación de la actividad de proteínas que reducen y eliminan los ROS (St-Pierre et al, 2003; Wenz et al, 2009; Geng et al, 2010; Leick et al, 2010). Además, PGC-1 α , protege al músculo esquelético de la atrofia, inhibiendo la actividad transcripcional de FoXO3 (Sandri et al, 2006).

En el **tejido adiposo marrón**, PGC-1 α regula el proceso de termogénesis adaptativa, regulando genes implicados en la β -oxidación y activando la expresión de UCP-1 (Puigserver et al, 1998; Wu et al, 1999). En respuesta a la estimulación de receptores β -adrenérgicos se produce AMP cíclico (AMPc) que activa al factor de transcripción CREB que es a su vez es un regulador de la expresión de PGC-1 α (Wu et al, 1999; Cao et al, 2004).

En el **sistema nervioso central** (SNC) la función de PGC-1 α ha generado cierta controversia ya que se han descrito dos modelos de PGC-1 α $^{-/-}$. Uno de los modelos presenta de forma espontánea, un proceso de degeneración neuronal (Lin et al, 2004; St-Pierre et al, 2006). Sin embargo, en el otro modelo no aparecen esos defectos neurológicos extensivos (Leone et al, 2005). Estas diferencias podrían relacionarse con la presencia o no en estos ratones de formas de *splicing* alternativo de PGC-1 α aún poco caracterizadas. Por

ejemplo, una forma corta de PGC-1 α parece estar altamente expresada en el SNC (Zhang et al, 2009; Chang et al, 2010). La expresión de PGC-1 α también parece estar regulada por la hipoxia en el SNC induciendo el proceso de biogénesis mitocondrial (Storey, 2003; Gutsaeva et al, 2008; Shoag & Arany, 2010).

En el **páncreas**, PGC-1 α se expresa en células β pancreáticas. Los estudios iniciales parecían indicar que la expresión de PGC-1 α estaba elevada en un modelo de diabetes tipo II (Yoon et al, 2003) que estaba acompañado por un incremento en la glucosa 6 fosfatasa y una expresión reducida de la glucoquinasa y que esta inducción, estaba mediada por un mecanismo que implicaba a los ácidos grasos (Zhang et al, 2005) y a la inactivación de FoXO1 (Kitamura et al, 2002). Sin embargo, estudios en humanos con diabetes tipo II, muestra que, los niveles de PGC-1 α están reducidos, lo que correlaciona con la disminución en la secreción de insulina en los islotes pancreáticos (Ling et al, 2008).

En el **riñón**, se ha descrito que el proceso de necrosis tubular aguda está asociado a la pérdida de la actividad de PGC-1 α y una disminución en la capacidad β -oxidativa (Portilla et al, 2002). Se ha propuesto que PGC-1 α protege del daño por IR al riñón (Rasbach & Schnellmann, 2007).

En el **sistema vascular** se ha propuesto que PGC-1 α participa en el control de procesos angiogénicos, regulando la migración de las células de la musculatura lisa y de las células endoteliales (Borniquel et al, 2006; Qu et al, 2009). También, podría ser importante en la prevención del proceso aterosclerótico, dado que su acción sobre el endotelio vascular, previene la disfunción endotelial asociada al incremento en los niveles de ROS (Valle et al, 2005; Schulz et al, 2008a). En el control de la expresión de PGC-1 α en el endotelio parecen ser claves el NO (Borniquel et al, 2006) y la histona deacetilasa tipo III SIRT1 NAD dependiente (SIRT1) (Chen et al, 2010).

Regulación de PGC-1 α en el hígado

La expresión de PGC-1 α en el hígado se induce de manera muy significativa el día uno del periodo postnatal (Lin et al, 2003). En el adulto, PGC-1 α se induce transcripcionalmente durante el ayuno, en respuesta al glucagón, en un mecanismo mediado por la activación de CREB (Herzig et al, 2001). La activación de PGC-1 α induce la gluconeogénesis, la β -oxidación de ácidos grasos, la cetogénesis, la biosíntesis del grupo hemo, la síntesis de homocisteína y estimula la absorción de lípidos intestinales mediante la regulación de los genes que controlan la homeostasis del ducto biliar (Handschin, 2009; Li et al, 2009). Además, PGC-1 α modula la secreción de lipoproteínas mediante la coactivación del factor LXR (Oberkofler et al., 2003) y disminuye la producción y secreción de triglicéridos (Zhang et al, 2004) lo que podría ser relevante en la esteatosis hepática.

El estudio de los ratones PGC-1 α ^{-/-} muestra que la deficiencia en PGC-1 α aunque cancela completamente la capacidad del animal de inducir la gluconeogénesis en respuesta al ayuno, no afecta a la gluconeogénesis basal que ocurre en el animal, incluso en condiciones de sobrealimentación, lo cual permite su supervivencia (Lin et al, 2004; Leone et al, 2005).

La actividad transcripcional de PGC-1 α sobre los genes implicados en la gluconeogénesis y en la β -oxidación de ácidos grasos en el hígado, está modulada positivamente por el sensor de nutrientes, SIRT1 y por la enzima AMPK (Rodgers et al, 2005; Lerin et al, 2006; Gerhart-Hines et al, 2007; Rodgers & Puigserver, 2007). La regulación negativa la ejerce la proteína AKT (proteína quinasa B) que fosforila a PGC-1 α y a FoXO1 en respuesta a la insulina (Li et al, 2007); la quinasa S6, que se activa en el hígado con la alimentación y que impide la regulación de PGC-1 α sobre los genes implicados en la gluconeogénesis (Lustig et al, 2011) y la acetil transferasa GCN5 (Rodgers et al, 2005; Lerin et al, 2006).

La expresión de PGC-1 α se encuentra muy inducida en un modelo de diabetes tipo I o insulino deficiente y en modelos de diabetes tipo II que presentan alta resistencia a la insulina (Hara et al, 2002; Hammarstedt et al, 2003). La expresión de PGC-1 α también aumenta en respuesta al ejercicio físico, junto con las enzimas de la gluconeogénesis (Banzet et al, 2009; Hoene & Weigert, 2010) sugiriendo una adaptación metabólica del hígado al ejercicio físico.

ROS Y EL DAÑO AL ADN

Estudios epidemiológicos muestran que la disfunción metabólica es un factor de riesgo para el desarrollo de tumores (Piatkiewicz & Czech, 2011), sin embargo, las bases moleculares de esta relación aún están sin esclarecer. El modelo más establecido, que intenta explicar la aparición de la inestabilidad genómica que lleva al desarrollo del tumor, propone que, la fragilidad genómica es máxima cuando se produce la replicación del genoma nuclear y que por tanto, cualquier proceso que favorezca la proliferación celular va a facilitar la inestabilidad genómica. Está bien establecido que los ROS pueden dañar directamente el ADN genómico, mediante la generación de mutaciones y además, los ROS favorecen la entrada de la célula en el ciclo celular a través de varios mecanismos, por ejemplo, mediante la activación del factor de transcripción NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Chatterjee et al, 2011). Todo esto hace pensar que los mecanismos que regulan la producción de ROS y la respuesta al daño genotóxico podrían estar unidos. Estudios recientes muestran que, el regulador transcripcional p53, factor clave en la respuesta al daño al ADN, es también un regulador del metabolismo mitocondrial y de la producción mitocondrial de ROS (Vousden & Ryan, 2009; Sahin et al, 2011).

Teniendo en cuenta que, PGC-1 α es el principal regulador de la actividad mitocondrial y que además PGC-1 α controla la producción de ROS generados en la mitocondria, nos planteamos que PGC-1 α podría estar también relacionado con los mecanismos que controlan el daño genotóxico y ser tal vez el factor clave que favorezca el desarrollo de tumores debido a una pérdida de actividad en la disfunción metabólica. Para llevar a cabo esta idea se decidió realizar en el laboratorio un “*screening*” de proteínas que interactuaban con PGC-1 α , mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras. Se utilizó como cebo la región carboxilo terminal de PGC-1 α (CTD) frente a una librería del ADNc humano. EL dominio CTD no tiene actividad transcripcional propia y es el responsable de mediar en la interacción con el factor de transcripción FOXO3a

en la regulación de los genes del sistema de detoxificación mitocondrial. Se obtuvieron 32 clones positivos, tres de los cuales correspondían al gen codificante de la proteínas *Translocated in liposarcoma* (TLS) también denominada *Fused in sarcoma* (FUS), una proteína con actividad transcripcional, implicada en la respuesta celular al daño genotóxico y cuyo mecanismo de acción está muy poco descrito (Hicks et al, 2000; Kuroda et al, 2000; Gardiner et al, 2008).

TLS/ FUS

TLS se descubrió originalmente como un protooncogén que, como consecuencia de una translocación cromosómica, forma una proteína de fusión con el factor transcripcional CHOP, implicada en el desarrollo de los liposarcomas (Croizat et al, 1993; Rabbitts et al, 1993).

La proteína TLS, forma parte de la familia de proteínas TET de unión a ARN (Morohoshi et al, 1998; Bertolotti et al, 1999). Las proteínas TET se asocian a sitios de ruptura en el ADN, se regulan por factores de respuesta a daño en el ADN y su deficiencia promueve la inestabilidad génica. Además, pueden participar en la reparación de las roturas de doble hebra de ADN por recombinación homóloga (Tan & Manley, 2009).

En el caso concreto de TLS, múltiples trabajos demuestran que TLS, no sólo es capaz de unirse al ARN, sino que también es capaz de interaccionar con el ADN de cadena simple y posiblemente con el ADN de doble cadena, siendo éste un proceso necesario para la reparación del ADN y la recombinación homóloga (Croizat et al, 1993; Prasad et al, 1994; Zinszner et al, 1997; Perrotti et al, 1998; Baechtold et al, 1999; Bertolotti et al, 1999; Bertrand et al, 1999; Wang et al, 2008).

Se han descrito dos modelos de ratones TLS^{-/-} (Hicks et al, 2000; Kuroda et al, 2000), en ambos se observó un problema de estabilidad genómica, aunque son fenotípicamente muy distintos. El primero de ellos muestra defectos en la diferenciación de linfocitos B, es muy pequeño al nacer y muere a las pocas horas del nacimiento (Hicks et al, 2000). En el segundo modelo, los ratones desarrollan esterilidad masculina (Kuroda et al, 2000) y sobre fondo genético mixto, sobreviven hasta la edad adulta aunque son muy sensibles a la radiación. Sobre este segundo modelo, se determinó que fibroblastos embrionarios provenientes de ratones TLS^{-/-} presentan defectos en el apareamiento cromosómico, además, de alta sensibilidad a la radiación ionizante (Kuroda et al, 2000).

La función de TLS en la estabilidad genómica está apoyado por estudios que demuestran que TLS está regulado por dos quinasas de respuesta a daño en el ADN, como son la quinasa c-ABL y la serina/treonina quinasa ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), (Perrotti et al, 1998; Gardiner et al, 2008).

Las proteínas TET son además capaces de regular los tres procesos esenciales que participan en el control de la expresión génica que son, la transcripción, el *splicing* y el transporte del ARNm (Tan & Manley, 2009). Se conoce muy poco acerca de los genes que son regulados transcripcionalmente por TLS. Se ha descrito la interacción de TLS con complejos de inicio de la transcripción (Law et al, 2006) así como su interacción con receptores nucleares, NF- κ B, Spi-1, que participa en la diferenciación de los linfocitos B y el

factor de transcripción en respuesta a estrés (YB-1), pudiendo regular la transcripción de la molécula de adhesión 1 (ICAM-1) (Hallier et al, 1998; Powers et al, 1998; Uranishi et al, 2001; Wang et al, 2008).

Un estudio reciente demuestra que TLS actúa coordinando funcionalmente la respuesta al daño genotóxico, la unión a ARN y la regulación de la transcripción. Además, demuestra que el gen ciclina D1 está regulado directa y negativamente por TLS. Este estudio demuestra que el daño genotóxico induce la activación de TLS y su unión a transcritos de ARN no codificante originados en la zona próxima al promotor de la ciclina D1, lo que dirige su reclutamiento a la región promotora, la inactivación del promotor y la inducción de la parada del ciclo celular (Wang et al, 2008). Este modelo está apoyado por estudios que muestran la acción antitumoral de TLS en tumores de próstata (Brooke et al, 2011).

TLS actúa como transportador de ARNm específicos dirigiendo su salida del núcleo hacia regiones citosólicas específicas, por lo que aunque se localiza preferentemente en el núcleo, también se puede encontrar en el citoplasma (Andersson et al, 2008; Dormann et al, 2010; Gal et al, 2010; Ito et al, 2010).

TLS y ROS

Se ha descrito recientemente que determinadas variantes de TLS se encuentran asociadas al desarrollo de una patología neurodegenerativa denominada esclerosis lateral amiotrófica familiar (ALS), una enfermedad caracterizada por la pérdida prematura de las neuronas motoras. Una multitud de estudios posteriores vino a demostrar que las formas mutantes de SOD1, que causaban esta patología, generaban un tipo de disfunción mitocondrial que cursaba con altos niveles de ROS (Blair et al, 2009; Chio et al, 2009; Kwiatkowski et al, 2009; Neumann et al, 2009; Tateishi et al, 2009; Vance et al, 2009; Groen et al, 2010; Syriani et al, 2011).

Estos trabajos parecían indicar que la función de TLS podría estar al igual que PGC-1 α , asociada a la actividad mitocondrial y al control de la producción de ROS por la mitocondria. Dichos estudios, junto con los resultados previos del laboratorio que indicaban que PGC-1 α parecía interactuar con TLS, nos llevaron a evaluar la posible implicación de TLS y PGC-1 α en el control de los ROS mitocondriales.

ROS Y LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA PATOLOGÍA HEPÁTICA

El hígado es el órgano principal en el control metabólico del organismo y en el proceso de detoxificación de drogas y toxinas absorbidas, haciendo que el hígado tenga una actividad mitocondrial muy alta y produzca gran cantidad de ROS, tanto a nivel mitocondrial como citosólico, por la acción de los sistemas de detoxificación tipo p450. Tal vez, por este motivo, es muy común la aparición de situaciones de estrés oxidativo asociadas a determinadas patologías hepáticas (Muriel, 2009). Por tanto, el control de la producción de ROS, es muy relevante a nivel hepático y su alteración tiene una gran importancia fisiopatológica. Un ejemplo bien caracterizado es la esteatosis hepática asociada al síndrome metabólico, en la que la acumulación hepática de lípidos produce lipotoxicidad a nivel mitocondrial, lo que genera una situación de estrés oxidativo (Hassanein & Frederick, 2004; Wu & Cederbaum, 2009) de gran importancia en la evolución de la esteatosis hacia la fibrosis o hacia la cirrosis hepática (Matteoni et al, 1999).

La esteatosis hepática se define como una enfermedad metabólica caracterizada por la acumulación de ácidos grasos o triglicéridos en el interior de los hepatocitos que puede desencadenar el origen de la esteatohepatitis y la fibrosis. Puede estar asociado a la ingesta de alcohol, que es lo que se conoce como esteatosis hepática alcohólica (EHA) o no asociada al alcohol denominado esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), normalmente asociada a la obesidad o al síndrome metabólico. El denominado síndrome metabólico se define como un conjunto de alteraciones metabólicas que incluye la hiperglicemia, hipercolesterolemia, dislipidemia, hipertensión y un índice de masa corporal superior a 29,9 (Pessayre, 2007; Fujita, 2008; Teramoto et al, 2008; Azevedo et al, 2009). Tanto la EHA como la EHNA son factores de riesgo en el desarrollo de la cirrosis y del carcinoma hepatocelular.

Se ha demostrado en pacientes con esteatosis de diferente etiología, así como en múltiples modelos de animales tanto de EHA como de EHNA, alteraciones mitocondriales asociadas a una producción elevada de ROS. Cabe destacar los estudios de Letteron et al, 1996; Seki et al, 2002; Albano et al, 2005; Carvalho et al, 2005; Bonawitz et al, 2006; Pessayre, 2007 y Serviddio et al, 2008). El proceso molecular que desencadena el estrés oxidativo parece estar asociado a la acumulación citosólica de ácidos grasos libres que entran en la mitocondria dónde no son metabolizados adecuadamente. El resultado es la acumulación de ROS de origen mitocondrial que al reaccionar con los ácidos grasos generan peróxidos que a su vez impactan negativamente en la capacidad de la mitocondria de producir ATP, además de dañar el resto de estructuras celulares (Fromenty & Pessayre, 1995; Chalasani et al, 2003; Donnelly et al, 2005; Feldstein & Bailey, 2011). El incremento en la peroxidación lipídica se ha observado tanto en modelos animales de hígado graso (Leclercq et al, 2000; George et al, 2003; Aharoni-Simon et al, 2011) como en pacientes con EHNA (Sanyal et al, 2001; Koruk et al, 2004; Videla et al, 2004).

En modelos murinos se ha determinado que la esteatosis inducida por la dieta grasa se asocia no sólo a un incremento en los niveles de ROS (Dobrian et al, 2001; Roberts et al, 2006), si no también, a una bajada en los niveles de expresión de los distintos componentes de la CTE mitocondrial, que parece estar asociado a unos niveles reducidos de factores reguladores de la biogénesis mitocondrial, como son TFAM y NRF-1 (Sparks et al, 2005). En humanos, también se ha descrito que la expresión de los genes relacionados con la función mitocondrial están disminuidos en paciente con EHNA (Sreekumar et al, 2003).

La lesión mitocondrial en el hepatocito asociada a la esteatosis puede desencadenar la apoptosis o la necrosis del hepatocito, facilitar la proliferación fibrilar, la deposición de matriz y el establecimiento de un estado inflamatorio crónico (Pessayre & Fromenty, 2005). En el hepatocito, los ROS mitocondriales inducen la apoptosis al facilitar la apertura del mPTP, lo que produce un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, la depleción de ATP, el colapso de la matriz mitocondrial y la liberación del Cyt-C al citosol, seguido por la activación de las caspasas y la inducción de la apoptosis celular (Madesh & Hajnoczky, 2001; Zhao et al, 2004; Tirosh et al, 2009). Los ROS también facilitan el proceso apoptótico al aumentar la expresión del ligando de FAS (Pessayre et al, 2001).

● Mecanismos responsables de la lesión por Isquemia-Reperfusión (IR)

El hígado y el riñón, son los órganos más trasplantados. El factor limitante en el trasplante hepático es la tolerancia del órgano trasplantado al proceso de IR (Connor et al, 1992; Ardite et al, 1999; Jassem & Heaton, 2004). La IR es la causa principal tanto del mal funcionamiento inicial del injerto, como de su rechazo. Por tanto, conocer las causas que determinan que unos órganos muestren tolerancia a la IR y otros no, puede facilitar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

La isquemia se define como la interrupción del flujo sanguíneo en los tejidos y tiene como consecuencia la disminución de la concentración de oxígeno (hipoxia), lo que genera una bajada en la capacidad mitocondrial para producir ATP. La depleción de ATP en el hígado se produce en las células de Kupffer, en las células endoteliales sinusoidales y en los hepatocitos (Selzner et al, 2007). La depleción de ATP se compensa inicialmente con un aumento de la glucólisis, que aumenta la producción de lactato, que al no poder eliminarse da lugar a una disminución en el pH intracelular. Para revertir la acidosis, el anti transportador de Na^+/H^+ se activa, lo que conduce a un incremento en los niveles de Na^+ que no se puede revertir, debido a la depleción de ATP, lo que a su vez genera un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular facilitando la activación de procesos apoptóticos y proinflamatorios (Nieuwenhuijs et al, 2006). Una vez restaurado el flujo (reperfusión), se produce un súbito aumento de los niveles de oxígeno, lo que desencadena la producción exacerbada de los ROS mitocondriales. Esta situación de estrés oxidativo unida a niveles altos de Ca^{2+} y acidosis (Hatanaka et al, 1995) provocan la apertura de mPTP y la entrada en apoptosis (Montalvo-Jave et al, 2008; Halestrap, 2009b).

Tras la perfusión se distinguen dos estadios o fases en la lesión hepática:

Fase inicial o aguda

Corresponde a las primeras horas de perfusión (<6h). En esta fase, los ROS parecen ser esenciales. Se produce la activación de las células de Kupffer, responsable según diversos autores de la propagación posterior del daño, ya que amplifican el daño oxidativo y da lugar a la liberación de citoquinas proinflamatorias (Jaeschke, 1991; Jaeschke, 2003).

Fase tardía o subaguda

Corresponde al periodo que sigue a las primeras 6 horas y se puede prolongar durante varios días. Se caracteriza por la aparición de la lesión inflamatoria provocada por la infiltración masiva de los neutrófilos en el tejido hepático (Jaeschke et al, 1999) y por la liberación de mediadores citotóxicos como las citoquinas y las moléculas de adhesión como la β_2 -integrina y el reclutamiento de las células efectoras que contribuyen a la amplificación del daño en el tejido (Jaeschke et al, 1992; Hasegawa et al, 2005).

El origen de los ROS en la lesión por IR ha generado cierta controversia. Algunos estudios sugieren que las células de Kupffer son los principales responsables de la generación de los ROS. Sin embargo, la eliminación de estas células no previene de la lesión por IR (Imamura et al, 1995; Knight & Jaeschke, 2002;

Taniai et al, 2004). Otros autores, basándose en estudios con inhibidores farmacológicos de sistemas generadores de ROS, han propuesto que la xantina oxidasa es el principal generador de ROS. La validez de estos estudios ha sido cuestionada, ya que estos inhibidores afectan también a la función mitocondrial (Caraceni et al, 1995; Young et al, 2002; Lluís et al, 2007). La implicación de los ROS mitocondriales en el daño por IR, al menos en su fase temprana, viene apoyado por estudios que demuestran una fuerte producción de ROS a nivel de los complejo I y III de la mitocondria (Solaini & Harris, 2005; Chen et al, 2006a; Pacher et al, 2006; Zweier & Talukder, 2006).

Los ROS desencadenan diferentes respuestas celulares, entre las que cabe destacar: la activación de HIF-1 α que induce el cambio de un metabolismo oxidativo a uno glicolítico (Rey & Semenza, 2010), la activación de factores de transcripción proinflamatorios como NF- κ B y AP-1 (Matsui et al, 2000; Schwabe & Brenner, 2006), que inducen la expresión de citoquinas como TNF α , la interleuquina 1 β (IL-1 β) y el interferón γ (Adamson & Billings, 1992; Sanlioglu et al, 2001), además, la inducción directa del proceso apoptótico (Schwabe & Brenner, 2006). Es importante destacar que no existe consenso sobre la contribución relativa de los procesos apoptóticos y necróticos en la lesión. Parece por ello lógico asumir que existe un alto grado de variabilidad dependiente del grado o del tiempo de hipoxia y de la consiguiente respuesta inflamatoria (Malhi et al, 2006; Schulze-Bergkamen et al, 2006; Smith & Mooney, 2007; Wang et al, 2009).

La acumulación de estudios que apoyan la relevancia de los ROS en el daño por IR ha llevado a proponer a los sistemas antioxidantes como moduladores de la intensidad del daño, observándose que niveles reducidos de SOD, Cat y GSPx parecen asociarse a lesiones más extensas (Yuan et al, 2005; Chen et al, 2006b). Se han intentado desarrollar estrategias terapéuticas basadas en el uso de antioxidantes, como la administración de vitamina E, la SOD, la cat, el α -tocoferol, la N-acetilcisteína, y de los precursores del glutatión para prevenir el daño hepático (Koeppel et al, 1996; Mizoe et al, 1997; Iimuro et al, 2000; Kessova et al, 2003; Schauer et al, 2004; Yuzawa et al, 2005; Kessova & Cederbaum, 2007).

Además de los ROS, el factor probablemente más relevante en la lesión por IR es el Ca²⁺. La activación por Ca²⁺ de la proteína quinasa Calcio-Calmodulina II (CaMKII) puede inducir tanto la apoptosis como la necrosis tras el proceso de IR (Yang et al, 2006; Vila-Petroff et al, 2007; Salas et al, 2010). Entre las evidencias que apoyan la relevancia de esta ruta se puede citar que la apertura del mPTP se puede prevenir con el uso de drogas como la ciclosporina A (CsA) que previenen la activación del Ca²⁺ por la CaMKII (*Calcium calmodulin-dependent protein kinase II*) (Griffiths & Halestrap, 1993).

Precondicionamiento isquémico (PCI)

Se define como un mecanismo en el cual breves periodos de isquemia, separados por periodos de perfusión, inducen en el órgano, sistemas de protección frente al daño por IR que le hacen más resistente a un proceso de isquemia sostenida (Murry et al, 1986).

El PCI fue descrito por primera vez, en un modelo canino de lesión por IR en el miocardio (Murry et al, 1986). Desde entonces, múltiples trabajos han demostrado que el PCI protege del daño por IR en diferentes especies (Downey et al, 1993), incluyendo humanos (Yellon et al, 1993; Clavien et al, 2000) y en

diversos órganos, como, el músculo esquelético (Pang et al, 1995), el corazón, (Murry et al, 1986; Cheng et al, 2010), la médula espinal (Matsuyama et al, 1997), el cerebro (Heurteaux et al, 1995), el riñón (Turman & Bates, 1997), la retina (Biermann et al, 2011), el intestino (Hotter et al, 1996) y el hígado (Lloris-Carsi et al, 1993; Peralta et al, 1996; Yin et al, 1998; Yoshizumi et al, 1998; Peralta et al, 1999; Knudsen et al, 2011). Sin embargo, el protocolo del PCI que consigue óptimos niveles de protección difiere entre los distintos órganos y especies. En el caso que nos ocupa, el hígado, el nivel de protección se consigue con un único ciclo de IR.

Los mecanismos que median en el PCI son objeto de intensos estudios debido a que su conocimiento permitirá reducir lesiones y mejorar la respuesta en los trasplantes. Sin embargo, en este aspecto aún no hay consenso. Lo que sí parece claro es que el PCI protege a la mitocondria del daño oxidativo manteniendo su estado redox (Glanemann et al, 2003; Lee & Lee, 2005) lo que produce una reducción de la generación de ROS por las mitocondrias de los hepatocitos y por las células inflamatorias. El PCI, reduce la disfunción endotelial, lo que reduce la expresión de moléculas de adhesión al endotelio y previene la infiltración de neutrófilos tras la IR, además atenúa la producción de citoquinas proinflamatorias durante la reperusión (Yoshizumi et al, 1998; Peralta et al, 2000; Serafin et al, 2004).



Mecanismos moleculares que median en el PCI

El PCI se ha descrito que opera en dos fases temporales:

La fase inicial: en la que la protección se hace efectiva minutos después de la reperusión y se prolonga hasta dos a tres horas después. Los efectos beneficiosos de esta fase son independientes de la síntesis de nuevas proteínas.

La fase tardía: en la que se inducen los mecanismos de protección entre las 12-24 horas tras la reperusión y los efectos se prolongan dos o tres días después. En este caso, la protección requiere la síntesis de “*novo*” de proteínas y en general los efectos beneficiosos son más leves que los de la fase inicial (Bolli, 2000; Pasupathy & Homer-Vanniasinkam, 2005).

A pesar del gran número de estudios relacionado con el PCI, existe cierta controversia acerca de cuál es el mecanismo responsables de la protección del tejido. EL PCI hepático requiere la activación de una compleja red de señales celulares que han sido revisadas en Alchera et al, 2010; Wong et al, 2010 y en Yang et al, 2010, que comprometen receptores de la superficie celular como proteínas G, receptores de citoquinas y receptores tirosina quinasas (Carini et al, 2004; Carini et al, 2006; Downey et al, 2007; Kobayashi et al, 2008; Miura et al, 2010).

En el PCI se ha implicado también al NO. El proceso de PCI induce un aumento en la síntesis de adenosina que conlleva la posterior estimulación del receptor de adenosina A2a. Las células endoteliales hepáticas responden aumentando la generación de NO, que parece contribuir a la modulación de la tolerancia del hepatocito a la IR, previniendo la activación del sistema inmune y reduciendo la producción de ROS (Peralta et al, 1997; Nakayama et al, 1999; Peralta et al, 1999; Cohen et al, 2000; Carini et al, 2001; Carini et al, 2003; Carini et al, 2006; Hart et al, 2008). Algunos autores han propuesto que la activación del NF- κ B (Funaki

et al, 2002; Teoh et al, 2002) y del transductor de señales y activador de la transcripción STAT, facilitan la supervivencia del hepatocito y que HIF-1 α permite la adaptación del tejido a la hipoxia (Imada & Leonard, 2000; Matsumoto et al, 2006). Aunque todavía no hay consenso, la mayor parte de los autores apoyan la hipótesis de que los iniciadores de esta respuesta son los ROS producidos en la mitocondria tras la IR, dado que el PCI no tiene lugar en presencia de antioxidantes y que la IR como tal, induce la producción de los ROS mitocondriales (Halestrap et al, 2007; Alchera et al, 2008; Cai et al, 2008; Murphy & Steenbergen, 2008). Entre los principales efectores de la protección frente a la isquemia figuran proteínas detoxificantes como la SOD y las proteínas de respuesta al choque térmico (HSP) (Kume et al, 1996; Redaelli et al, 2002).

Cuando un tejido como el hígado se expone a concentraciones subletales de ROS, éstos inducen la expresión de diversos sistemas antioxidantes, como las hemo-oxigenasas, SOD1, Prxs, Trxs, GPxs, GR, inhibiendo la formación de H₂O₂ tras la reperusión (Peralta et al, 2002; Sindram et al, 2002; Rudiger et al, 2003; Schauer et al, 2003; Schauer et al, 2004; Carini et al, 2006; Kim et al, 2010). Además, se ha sugerido que las proteínas UCPs pueden mediar en el PCI (Bienengraeber et al, 2003; Ganote & Armstrong, 2003).

En conclusión, los ROS parecen tener una actuación clave como señalizadores en el inicio de la respuesta frente al estrés oxidativo y esta respuesta a su vez está muy dirigida a mejorar la función mitocondrial y a prevenir la acumulación de los ROS (Alchera et al, 2010; Theodoraki et al, 2011).

Esteatosis y lesión por IR

Debido a la escasez de donantes, se hace necesaria la utilización de órganos subóptimos o marginales (Mor et al, 1992; Busuttil & Tanaka, 2003). Hasta un 40% de los hígados donados presentan esteatosis hepática y son descartados para su uso debido a que soportan mucho peor el proceso de IR que los hígados sanos y además no responde al PCI (Franchello et al, 2009). Debido al alto porcentaje de la población que presenta este problema, es necesario encontrar los mecanismos que permitan mejorar la resistencia de estos órganos y aumentar así la cantidad de donantes disponibles. El hecho de que no respondan bien al PCI podría estar relacionado con los elevados niveles de ROS presentes en el tejido incluso en condiciones basales; esta hipótesis está apoyada por estudios que demuestran que la aplicación intravenosa de glutatión disminuye la lesión por IR que se produce en el trasplante del hígado graso (Pratschke et al, 2010).

Teniendo en cuenta que la obesidad va normalmente asociada a una disminución en la actividad de PGC-1 α (Patti et al, 2003; Yang et al, 2003; Semple et al, 2004; Aharoni-Simon et al, 2011; Barroso et al, 2011) que PGC-1 α es un regulador de la función mitocondrial y de los sistemas antioxidantes y que los ROS están implicados en el daño por IR y son claves en el PCI, pensamos que, era posible, que la mala respuesta del hígado graso al trasplante hepático pudiera estar asociada a una pérdida en la actividad de PGC-1 α . Si esta teoría fuera correcta la inducción de PGC-1 α en el hígado graso, podría mejorar su estado metabólico y permitiría el uso de estos órganos en el trasplante. Esta hipótesis viene apoyada por estudios que muestran que la actividad de PGC-1 α se induce tanto en respuesta a hipoxia como en presencia de niveles elevados de ROS y de NO.

OBJETIVOS

El objetivo central de la tesis fue estudiar los mecanismos que median en la regulación de los genes antioxidantes regulados por PGC-1 α en el hígado y la relevancia fisiopatológica de esta regulación. Por ello, se persiguieron los siguientes objetivos concretos:

Objetivo 1.- Identificar factores o cofactores que regulan la actividad de PGC-1 α sobre los genes antioxidantes en el hígado.

- ❖ Determinar si TLS, una proteína implicada en la respuesta al daño genotóxico y previamente identificada en un “*screening*” de doble híbrido para proteínas que interaccionan con PGC-1 α es realmente un cofactor de PGC-1 α , en la regulación de la expresión génica y forma con PGC-1 α , un complejo en la célula.
- ❖ Analizar si TLS está directamente implicado en la regulación de los genes antioxidantes.
- ❖ Valorar el posible efecto cooperativo entre PGC-1 α y TLS en la regulación de los sistemas antioxidantes.
- ❖ Caracterizar el grado de dependencia entre PGC-1 α y TLS en la regulación transcripcional de los sistemas antioxidantes.
- ❖ Evaluar a nivel genómico la actividad transcripcional de TLS y determinar su grado de dependencia de PGC-1 α .

Objetivo 2.- Examinar la posible contribución de la regulación de los genes antioxidantes mediada por PGC-1 α en la respuesta del hígado a los procesos de isquemia-reperfusión (IR).

- ❖ Determinar si la expresión de PGC-1 α está regulada en respuesta a la IR y comparar dicha respuesta en el hígado normal y en el hígado graso.
- ❖ Analizar si la expresión de los sistemas antioxidantes regulados normalmente por PGC-1 α ven alterada su expresión en respuesta a la IR y si esta respuesta depende de la presencia de PGC-1 α .
- ❖ Evaluar como la ausencia de PGC-1 α , en ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ o su menor actividad, en ratones con hígado graso, repercute en la tolerancia hepática al daño isquémico.
- ❖ Caracterizar como la ausencia de PGC-1 α , en ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ o su menor actividad, en ratones con hígado graso, repercute en la inducción de los mecanismos de protección frente al daño isquémico, en respuesta a un protocolo de preconditionamiento isquémico.
- ❖ Establecer un modelo “*in vitro*” de IR que permita determinar los mecanismos implicados en la regulación de la expresión y la actividad de PGC-1 α en respuesta a cambios en la tensión de oxígeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Los estudios se llevaron a cabo con ratones C57BL/6 PGC-1 α ^{+/+} y PGC-1 α ^{-/-}. Los ratones PGC-1 α ^{-/-} proceden originalmente del laboratorio del Dr. B. Spiegelman y fueron descritos en Lin et al, 2004

Los ratones se alojaron en el animalario del I Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Su mantenimiento se realiza de acuerdo a la legislación española sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 1201/2005 y Ley 32/2007). La legislación española es una trasposición de la Directiva 86/609/EEC. Las condiciones de alojamiento y manejo reflejan las recomendaciones de la Comisión del Consejo de Europa del 18 de junio del 2007 sobre guías para el alojamiento y cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Los ratones se mantuvieron libres de parásitos específicos y bajo condiciones controladas de luz, presión y temperatura, permitiéndoles el acceso *ad libitum* de agua y comida. Para el mantenimiento de los animales se empleó una dieta estándar proporcionada por Labdiet®. La esteatosis hepática fue inducida mediante la alimentación durante 7 semanas con la dieta grasa de Harlan TD88137 q contiene en relación p/v 17,3 % de proteínas, 48,5% de carbohidratos y 21,2% de grasas.

Todos los procedimientos realizados, como parte del trabajo experimental con animales en el CNIC han sido aprobados previamente por el Comité Ético del CNIC. Los protocolos utilizados para la manipulación de los animales están de acuerdo con la Declaración de Helsinki y la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) (número de publicación 85-23).

CULTIVOS CELULARES

Cultivos primarios

● **Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) PGC1 α ^{+/+} y PGC1 α ^{-/-}** se obtuvieron a partir de embriones de 12,5-13,5 días de desarrollo. Tras separar los embriones de la placenta y lavarlos con solución salina, se eliminó la cabeza y las vísceras; el resto del embrión se trituró y se incubó con tripsina (0,25% / 1 mM EDTA) (p/v) (Gibco), a 37°C durante 45 minutos. Posteriormente, la preparación es disgregada mecánicamente mediante pipeteo y diluida en medio DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) (Sigma) suplementado con el 10% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma), 2 mM de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza) y 1% de aminoácidos no esenciales. Las células se depositaron en placas p60 (Nunc-Inmuno™) y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 24 horas. Pasadas 24 horas se renueva el medio con el fin de eliminar restos celulares derivados del proceso de aislamiento

■ **Los Fibroblastos Embrionarios de ratón (MEF) $TL\alpha^{+/+}$ y $TL\alpha^{-/-}$** inmortalizados fueron donados por el Dr. Ron (NYU, USA). Se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, y 1% penicilina/estreptomicina.

■ **Los hepatocitos** se aislaron de ratones C57BL/6 $PGC1\alpha^{+/+}$ y $PGC1\alpha^{-/-}$ mediante perfusión hepática y digestión con colagenasa, como se describe en Rana et al, 1994; Bahjat et al, 2000. Para ello, el hígado del ratón anestesiado vía intraperitoneal, se perfunde a través de la vena cava caudal, durante 10 minutos, a un flujo constante de 7 ml/min generado por una bomba de perfusión Masterflex L/S modelo 7518-00 (Cole-Parmer instrument Company) con una solución de lavado que contiene: NaCl 150 mM; KCl 5,5 mM; HEPES 10 mM a pH 7.5; $NaHCO_3$ 25 mM y EGTA 0,5 mM; y a continuación se digirió el tejido con una solución de digestión que contiene NaCl 150 mM; KCl 5,5 mM; HEPES 10 mM a pH 7,5; $NaHCO_3$ 25 mM; $CaCl_2$ 0,5 mM y colagenasa (Actividad 150 Unidades/ml, Roche) al 0,05% (p/v) manteniendo el mismo flujo constante. Tras la digestión, el hígado se deposita en un material cerámico y se disgrega el tejido mecánicamente con el émbolo de una jeringa. La preparación obtenida se pasa por un filtro de 70 μ m (Becton Dickinson), con el fin de obtener una suspensión celular, que posteriormente se centrifuga a 50 g durante 5 minutos a 4°C con el fin de eliminar los restos de colagenasa. Tras la centrifugación, las células se resuspenden en medio Williams E (Gibco) suplementado con 10% de SFB y se pasan por un segundo filtro. Finalmente el porcentaje de hepatocitos viables se determina mediante tinción con el colorante azul tripan blue y conteo en una cámara de Neubauer.

Los hepatocitos obtenidos se cultivan sobre un matriz placas de de gelatina (0,2%) y colágeno (1%) en medio Williams E suplementado con el 10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 nM de dexametasona (Sigma), 100 nM de insulina (Roche) y 1% penicilina/estreptomicina.

Líneas celulares

■ **FAO (línea celular de hepatoma de rata).** Se cultivaron en medio RPMI (Sigma) suplementado con el 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina.

■ **HEK-293A (células embrionarias de riñón humanas, portadora del gen EIA).** Se cultivaron en medio DMEM suplementado con el 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina.

TRATAMIENTOS DEL MEDIO DE CULTIVO

- Ionóforo: (calbiochem). Se añadió al medio de cultivo a una concentración final de 1 μ M.
- Ciclosporina A: (Sigma). Se añadió al medio de cultivo a una concentración final de 1 μ M.
- Antioxidante EUK 189. Se añadió al medio de cultivo a una concentración final de 100 μ M (Melov et al, 2001).

PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 1.

Plásmido	Características	Referencia
pShuttle-CMV		Quantum
Shuttle pS-HA-PGC-1 α	Porta la secuencia codificante de PGC-1 α , con tres copias de la secuencia del péptido de la hemaglutinina (HA) en el extremo 5', insertada entre los sitios Sal I y EcoR V del plásmido pShuttle-CMV	(Valle et al, 2005)
pS-HA-PGC-1- Δ SR	Porta la secuencia codificante de PGC-1 α - Δ SR (Δ 564-634). (Monsalve et al, 2000). con tres copias de la secuencia del péptido de la HA en el extremo 5', insertada entre los sitios Sal I y EcoR V del plásmido pShuttle-CMV	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
pS-HA-PGC-1- Δ RRM/SR	Porta la secuencia codificante de PGC-1 α - Δ RRM/SR(Δ 564-710) (Monsalve et al, 2000) con tres copias de la secuencia del péptido de la HA en el extremo 5' insertada entre los sitios Sal I y EcoRV del plásmido pShuttle-CMV	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
pS-HA-PGC-1- Δ CTD	Porta la secuencia codificante de PGC-1 α - Δ CTD (Δ 564-797) (Monsalve et al, 2000). con tres copias de la secuencia del péptido de la HA en el extremo 5', insertada entre los sitios Sal I y EcoR V del plásmido pShuttle-CMV	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
pS-HA-PGC-1- Δ RRM	Porta la secuencia codificante de PGC-1 α - Δ RRM (Δ 677-710) (Monsalve et al, 2000). con tres copias de la secuencia del péptido de la HA en el extremo 5', insertada entre los sitios Sal I y EcoR V del plásmido pShuttle-CMV	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
pS-TLS	Porta el ADNc de TLS subclonado entre los sitios KpnI y XhoI del plásmido	(Sanchez-Ramos et al, 2011)

	pShuttle-CMV	
pSG5-FL-TLS	Donado por el Dr.D. Hickstein	(Yang et al, 2000)
pGEX		GE Healthcare
pGEX-TLS	Donado por el Dr. T. Okamoto	(Uranishi et al, 2001)
pGEX PGC- α CTD		(Olmos et al, 2009)
pcDNA3.1		Invitrogen
pcDNA3.1-Flag-PGC-1		(Monsalve et al, 2000)
pcDNA 3.1-Flag-PGC-1- Δ CTD		(Monsalve et al, 2000)
pcDNA3.1-Flag-PGC-1 α - Δ SR	Porta el ADNc de PGC-1 α - Δ SR con la secuencia Flag en su extremo 5', subclonado entre los sitios AgeI y EcoRV del plásmido pcDNA3.1	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
pcDNA 3.1-Flag PGC-1- Δ RRM/SR	Porta el ADNc de PGC-1 α - Δ RRM/SR con la secuencia Flag en su extremo 5', subclonado entre los sitios AgeI y EcoRV del plasmido pcDNA3.1	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
pcDNA 3.1-Flag PGC-1- Δ RRM	Porta el ADNc de PGC-1 α - Δ RRM con la secuencia Flag en su extremo 5', subclonado entre los sitios AgeI y EcoRV de pcDNA3.1	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
5xUAS-luc		(Puigserver et al, 1999)
G4-PGC-1		(Puigserver et al, 1999)
pcDNA3.1/V5-His TOPO		Invitrogen
pcDNA3.1V5-TLS	Porta el ADNc de TLS, clonado en el vector pcDNA3.1/V5-His TOPO	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
pcDNA3.1-TLS (1-471)	Porta el ADNc de TLS (1-471) clonado en el vector pADNc3.1/V5-His TOPO	
pcDNA 3.1-TLS (1-427)	Porta el ADNc de TLS (1-427) clonado en el vector pADNc3.1/V5-His TOPO	
pcDNA3.1-TLS (1-367)	Porta el ADNc de TLS (1-367) clonado en el vector pADNc3.1/V5-His TOPO	
pcDNA 3.1-TLS (1-275)	Porta el ADNc de TLS (1-275) clonado en el vector pADNc3.1/V5-His TOPO	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
pADNc 3.1-TLS (269-525)	El ADNc de TLS (269-525) fue clonado	(Sanchez-Ramos et al,

	en el vector pADNc3.1/V5-His TOPO.	2011)
pAdEasy-1		Quantum
pAd- Shuttle	Plásmido adenoviral generado por recombinación de los vectores pAdEasy-1 y pShuttle-CMV.	(Valle et al, 2005)
pAd- PGC1 α	Plásmido adenoviral generado por recombinación de los vectores pAdEasy-1 y pS-HA-PGC-1 α .	(Olmos et al, 2009).
pAd-TLS	Plasmido adenoviral generado por recombinación de los vectores pAdEasy-1 y pS-TLS.	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
p-Shuttle silencer 1.0-CMV		Ambion
pS-shPGC1 α	La secuencia correspondiente al shRNA de PGC-1 α descrito en la tabla 2 fue clonada en el vector linearizado pShuttle silencer 1.0-CMV	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
pS-shTLS	La secuencia correspondiente al shRNA de TLS descrita en la tabla 2 fue clonada en el vector linearizado pShuttle silencer 1.0-CMV	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
pS-shControl	La secuencia correspondiente al shRNA descrita en tabla 2 fue clonada en el vector linearizado pShuttle silencer 1.0-CMV	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
p-Ad-shPGC1 α	Plasmido adenoviral generado por recombinación de los vectores pS-shPGC1 α y pAdenoviral LacZ Backbone	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
p-Ad-shTLS	Plasmido adenoviral generado por recombinación de los vectores pS-shTLS y pAdenoviral LacZ Backbone	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
p-Ad-shControl	Plasmido adenoviral generado por recombinación de los vectores pS-shControl y pAdenoviral LacZ Backbone	(Sanchez-Ramos et al, 2011)
p-Adenoviral LacZBackbone		Ambion

Tabla 1. Lista de plásmido generados para los ensayos de interacción entre proteínas in vitro y para la generación de adenovirus.

GENERACIÓN DE ADENOVIRUS

Los vectores adenovirales se generaron según el método detallado en (He et al., 1998). El ADNc de interés se clonó en un vector lanzadera (**Shuttle**). Para la generación de los adenovirus de sobreexpresión se utilizó como vector lanzadera el plásmido pShuttle-CMV y para los adenovirus de interferencia se utilizó como vector lanzadera el plásmido pSilencer según se describe en la tabla 1, en la que se clonó la secuencia de interés.

El vector adenoviral recombinante fue generado por recombinación homóloga entre el vector lanzadera y un vector adenoviral básico (“Backbone”), pAdenoviral LacZ Backbone/pAd-Easy-1 mediante cotransformación de ambos plásmidos en bacterias *E. coli* BJ5183 ó en células 293^a.

La generación de partículas virales se realizó en células empaquetadoras HEK-293A, portadoras del gen adenoviral E1A, ausente del vector adenoviral y necesario para la generación de partículas virales.

La expansión de las partículas virales se llevó a cabo mediante infecciones sucesivas de un número creciente de placas de HEK-293A. Las células se recogen mecánicamente cuando se empiezan a observar efectos citopáticos, debidos a la acumulación de partículas virales, se centrifugan durante 2 minutos a 805 g y se resuspenden en la solución tamponante PBS (del inglés *phosphate buffer*). Seguidamente, se lisan las células mediante ciclos de congelación/descongelación y agitación vigorosa. Finalmente, se eliminan los restos celulares por centrifugación a 322 g durante 4 minutos.

La determinación del título viral se realiza por el método de dilución límite. En breve, diluciones seriadas de una suspensión viral se utilizan para infectar una placa de 96 pocillos de células HEK-293A confluentes y se mantienen cultivo durante 15 días. Transcurrido ese tiempo, se realiza un recuento del número de pocillos con halos de lisis en las distintas diluciones, lo que permite determinar el número de partículas virales activas presentes en la preparación original. En general se obtuvieron títulos del orden de 10¹¹ unidades formadoras de placa/ml (UFP/ml).

Los adenovirus utilizados son:

- ✱ Adenovirus de sobreexpresión de PGC-1 α : Ad- PGC-1 α
- ✱ Adenovirus de sobreexpresión de TLS: Ad-TLS
- ✱ Adenovirus control: Ad-Control
- ✱ Adenovirus de interferencia de PGC-1 α : Ad-shPGC-1 α
- ✱ Adenovirus de supresión de TLS: Ad-shTLS
- ✱ Adenovirus de supresión control Ad-shControl

INFECCIÓN CON ADENOVIRUS

Los hepatocitos primarios de ratón, las células MEF y las células FAO se infectaron con los adenovirus descritos anteriormente, con una multiplicidad de infección (moi del inglés *multiplicity of infection*) de 1/50 (células/partículas virales) durante 12-16 horas. Tras la infección se lavan los cultivos con PBS y se añade medio de cultivo fresco. Transcurridas 24 ó 48 horas, se recogen las células para su posterior análisis.

En todos los experimentos realizados, se comparó el efecto del adenovirus de expresión/supresión de la proteína de interés con el de un adenovirus control. Para los ensayos con los vectores adenovirales de sobreexpresión, se utilizó el vector adenoviral vacío, Ad-Shuttle y para las infecciones con sh-Ad-TLS y sh-AdPGC-1 α se utilizó un adenovirus que expresa un RNA de interferencia control, sh-Ad-Control.

ARN

Aislamiento y purificación

Para el aislamiento del ARN total de células se usó el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron con TRIzol. A continuación, mediante la adición de cloroformo (MERCK) seguida de centrifugación 12000 g durante 15 minutos, se separó la solución en tres fases, recuperando el ARN de la fase acuosa por precipitación con alcohol isopropílico (0,7%) (Sigma-Aldrich). Tras el lavado con etanol al 70% (MERCK), el ARN extraído se resuspendió en agua libre de ribonucleasas. Posteriormente se cuantificó por espectrofotometría (spectrophotometer ND1000, Nanodrop®) y se comprobó su pureza y calidad mediante electroforesis en gel de agarosa.

Retrotranscripción (RT)

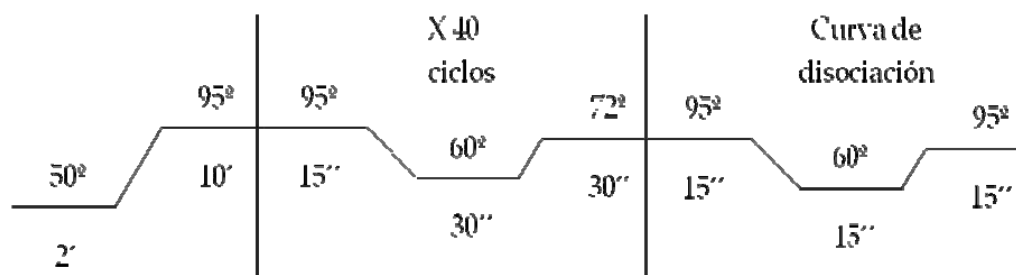
La retrotranscripción a ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 1 μ g de ARN total previamente calentado 2 minutos a 72°C. Se utilizó la transcriptasa reversa M-MLV (*Moloney Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase*, *Invitrogen*) incubada a 37°C durante 45 min en presencia de una mezcla de hexámeros (GE Healthcare) cebadores.

Análisis cuantitativo de los niveles de ARNm

El análisis cuantitativo de la expresión génica se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) en Sistemas de Detección de Secuencia (SDS) 7900 y 7900FAST de Applied Biosystems.

Para la mayor parte de los genes estudiados se diseñaron oligonucleótidos específicos que fueron sintetizados por Invitrogen (Tabla 2), para la reacción de la qPCR se utilizó SYBR Green I Dye (SYBR Green master Mix 2X, Applied Biosystems). Para los genes 18S y TrxR2 se emplearon sondas comerciales Taqman (Tabla 3). En estos casos la amplificación se llevó a cabo con TaqMan Master Mix 2X (Applied Biosystems).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:



Los datos fueron analizados con el programa de análisis SDS por el método de la cuantificación relativa por comparación de C_T (*threshold cycle* umbral de detección establecido). Para la normalización de los niveles de expresión del gen de interés se utilizó la expresión del 18S (18S rRNA VIC-MGB, Applied Biosystems) como control de carga, a excepción de los experimentos realizados en hepatocitos en los que se utilizó la expresión de la β -actina (tabla 2).

● Estudios de expresión génica de genoma completo con microarrays

Se realizaron tres aislamientos independientes de hepatocitos primarios de ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$. Los hepatocitos fueron infectados con Ad-shTLS ó Ad-shControl. Se aisló el RNA con Trizol y se sometió a una segunda ronda de purificación con el Kit RNAeasy (Invitrogen). El RNA fue cuantificado y se comprobó su integridad en un Agilent Bio Analyzer QC)

Para la detección de la señal de hibridación se utilizó el escáner G2565BA de Agilent. Las imágenes fueron analizadas con el programa Feature Extraction sov10.1.1.1 (Agilent Technologies). El análisis posterior de los datos se llevó a cabo usando el programa GeneSpring para el contraste shTLS/shControl. Los valores obtenidos se representan en escala Log₂ y se acompañan del valor p corregido, considerandose estadísticamente significativos valores de $p < 0.05$. El análisis de las funciones asociadas a los genes regulados se realizó utilizando el programa funcional se utilizó el programa *Ingenuity*.

Gen	Especie	Directo	Reverso	Ensayo
β -actina	<i>Mus musculus</i>	5'-gttcctcttcgcctgactgtt-3'	5'-ctgaaccgtttccgttgctt-3'	ChIP
	<i>Rattus norvegicus</i>	5'-gttcctcttcgcctgactgtt-3'	5'-ctgaaccgtttccgttgctt-3'	ChIP
cat	<i>Rattus norvegicus</i>	5'-gtcaccactccagcggg-3'	5'-gctcctccactgcttcac-3'	ChIP
MnSOD	<i>Rattus norvegicus</i>	5'-ccttaccagccagtcac-3'	5'-aatcactaaggaaacagaaggc-3'	ChIP
Prx3	<i>Mus musculus</i>	5'-caaatgaacgccccaca-3'	5'-aatccagttcccttctatctcag-3'	ChIP
	<i>Rattus norvegicus</i>	5'-tttcaagcacagaagctctgg-3'	5'-tgggatcttctgccttctgcat-3'	ChIP
Prx5	<i>Mus musculus</i>	5'-gggagggtctgggcaggcgatgcc-3'	5'-gggagggtctgggcaggcgatgcc-3'	ChIP
	<i>Rattus norvegicus</i>	5'-ggggagctaggcaggatgaa-3'	5'-gggtgggttcggtgtctgtg-3'	ChIP
UCP-2	<i>Rattus norvegicus</i>	5'-tgtgctaaggctcgggtcc-3'	5'-tggaaagtgcagtgagg-3'	ChIP
Atpase β	<i>Rattus norvegicus</i>	5'-gttcacctctgtcaggactatg-3'	5'-tgtgctctcacccaaatgctgg-3'	qPCR
β -actina	<i>Mus musculus</i>	5'-caccttcagcagatgtgga-3'	5'-agcatttgcggtggacgatgg-3'	qPCR
Cat	<i>Mus musculus</i>	5'-catgcatgacaaccagggtgt-3'	5'-gaattgcgttcttagcttctca-3'	qPCR
	<i>Rattus norvegicus</i>			qPCR
Cyt C	<i>Mus musculus</i>	5'-gccaaataagaacaaaggcatca-3'	5'-gttttgaataaataaggcagtg-3'	qPCR
	<i>Rattus norvegicus</i>			qPCR
COX-4	<i>Rattus norvegicus</i>	5'-acgagctcatgaaagtgtgtg-3'	5'-aatgcgatacaactcgactttctc-3'	qPCR
MCAD	<i>Mus musculus</i>	5'-gatttagtttgagttcaccgaac-3'	5'-tccaagacctccacagttctc-3'	qPCR
MnSOD	<i>Mus musculus</i>	5'-tggccaaggagatgtgttac-3'	5'-cagcaactctcctttgggttc-3'	qPCR
	<i>Rattus norvegicus</i>			qPCR
NEIL2	<i>Mus musculus</i>	5'-agtgccaggctggtactcc-3'	5'-ccctaatcctgagaagtatctct-3'	qPCR
NRF1	<i>Rattus norvegicus</i>	5'-tgcaggctctgtgggaatggctgc-3'	5'-gtacttgcgcaccacattctc-3'	qPCR
PARK2	<i>Mus musculus</i>	5'-tgcacagatgtcaggagccc-3'	5'-cctgtgtactgctcttctcca-3'	qPCR
PGC-1 α	<i>Mus musculus</i>	5'-ggcagtagatcctcttcaagatc-3'	5'-tcacacggcgctcttcaattg-3'	qPCR
	<i>Rattus norvegicus</i>			qPCR
Prx3	<i>Mus musculus</i>	5'-tctggctcctcggtgctcgt-3'	5'-gtggaaagaggaactgggtct-3'	qPCR

	<i>Rattus norvegicus</i>			qPCR
Prx5	<i>Mus musculus</i>	5'-ccaatcaaggtgggagatgcc-3'	5'-ccaggcacttagaacagcca-3'	qPCR
	<i>Rattus norvegicus</i>			qPCR
UCP-2	<i>Mus musculus</i>	5'-cagttctacaccaagggctcag-3'	5'-catggagaggctcagaaaggtgc-3'	qPCR
	<i>Rattus norvegicus</i>			qPCR
TFAm	<i>Rattus norvegicus</i>	5'-gaggagagaattaattttgc-3'	5'-tttagcaagctgaatatatgc-3'	qPCR
TLS	<i>Mus musculus</i>	5'-ccgatacctgtcgtcttggtc-3'	5'-cctccaccaccgccacctcct-3'	qPCR
	<i>Rattus norvegicus</i>			qPCR
Trx2	<i>Mus musculus</i>	5'-cagggagatggctcagcga-3'	5'-gaccacaccattgtgcatgga-3'	qPCR
	<i>Rattus norvegicus</i>			qPCR
shPGC-1 α	<i>Homo sapiens</i>	5'-tcgagttcatggagcaataaagcgttcagagacgctttattgctccatgaatta-3'	5'-ctagtaattcatggagcaataaagcgttctcttgaacgctttattgctccatgaac-3'	shRNAs
shTLS	<i>Homo sapiens</i>	5'-tcgaggcgagaatgttacaattgattcaagaatcaattgtaacattctcgcc-3'	5'-ctagtaggcgagaatgttacaattgattctcttgaatcaattgtaacattctcgcc-3'	shRNAs
shControl	<i>Homo sapiens</i>	5'-tcgagcaccacagagctgccatcctcaaggagagatggcagctctgtggtgtta-3'	5'-ctagtaacaccacagagctgccatcctctctgaaggatggcagctctgtggtgc-3'	shRNAs

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para ensayos de ChIP, qPCR y generación de adenovirus de shARNs.

Gen	Sonda	Fabricante
18S	18S rRNA pre-developed Endogenous Control, VIC-MGB (4319413E)	Applied Biosystem
TrxR2	Mm00496771_m1, 73717G4	

Tabla 3. Oligonucleótidos comerciales (Sondas Taqman) utilizados para Qpcr

PROTEÍNAS

Obtención de extractos celulares totales

Para la obtención de los extractos celulares totales se lavaron las células dos veces con PBS frío y se lisaron en presencia de una solución que contiene HEPES, 20 mM pH 7.9; NaCl, 125 mM; NP-40, 1%; EDTA, 1 mM; β -glicerolfosfato, 5 mM; NaV, 0,2 mM; NaF, 0,2 mM; NaP, 10 mM e inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma).

Cuantificación e inmunodetección en soportes de membrana (Western Blot)

Las muestras de proteínas obtenidas se cuantificaron por colorimetría mediante una modificación del método de Lowry (Bio-Rad DC Protein Assay). Posteriormente, 30 µg de proteína desnaturalizada se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Hybond™-P (Amersham Biosciences). Con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios o secundarios a las membranas, éstas se bloquearon durante 1 hora con leche desnatada al 5% en Tris Buffer Salino con 0,1% de Tween 20 (TBS-T). A continuación, se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos de las proteínas de interés (Tabla 4). Tras lavar las membranas tres veces con TBS-T, se realizó la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP-conjugados) (Tabla 5), durante 45 min a temperatura ambiente. A continuación se realizaron otros tres lavados con TBS-T de 15 min cada uno. Por último, el revelado se llevó a cabo mediante el sistema de detección quimioluminiscente ECL (Amersham Biosciences) y la exposición de películas autorradiográficas (AGFA).

Inmunoprecipitación (IP)

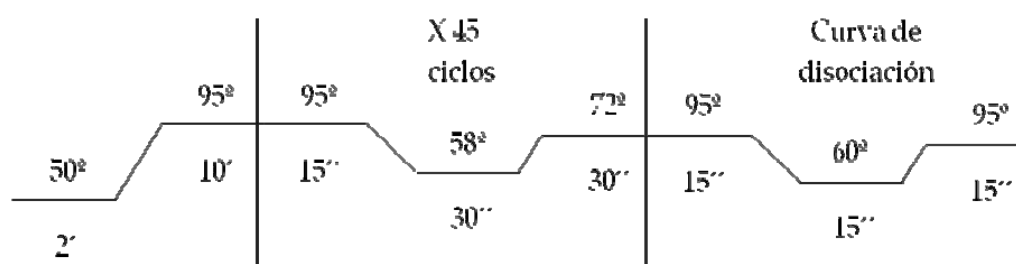
La preparación de los extractos se llevó a cabo como se describe en (Monsalve et al, 2000); para ello las células se resuspendieron en solución de lisis (HEPES, 20 mM, pH 7,9; NaCl, 125 mM; NP-40, 0,1%; EDTA, 1 mM; β-glicerolfosfato, 5 mM; NaV, 0,2 mM; NaF, 0,2 mM; NaP, 10 mM e inhibidores de proteasas) se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación rápida en nitrógeno líquido, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron 13400 g para eliminar los restos celulares, conservando el sobrenadante. Para llevar a cabo las inmunoprecipitaciones se utilizó 1 mg de proteína, que se incubó con el anticuerpo correspondiente durante toda la noche a 4°C y en agitación orbital (las diluciones utilizadas se encuentran en la Tabla 2). Tras la adición de proteína A/G-Agarosa (Santa Cruz) y posterior incubación de dos horas a temperatura ambiente y en agitación orbital, los inmunocomplejos se recogieron por centrifugación, se lavaron tres veces con PBS frío y finalmente se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE, siguiendo el protocolo descrito anteriormente para la detección de proteínas por Western Blot.

Como anticuerpo control para las inmunoprecipitaciones se usó la Inmunoglobulina G (IgG) de conejo o de ratón (Santa Cruz).

Inmunoprecipitación de cromatina (chIP)

La preparación de los extractos proteínicos para ChIP se llevo a cabo siguiendo el protocolo descrito en (Valle et al, 2005) con pequeñas modificaciones. Las células se fijaron con una solución de formaldehído al 1% (Fluka) durante 15 min; a continuación se lavaron, se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en la solución de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA, 1% de dodecil sulfato sódico (SDS) e inhibidores de proteasas). A continuación, las muestras se sometieron a sonicación para fragmentar el ADN y se eliminaron los restos por centrifugación. La preparación de cromatina obtenida fue diluída 10x en una

solución sin SDS y concentrada con centrífuga 30, con el fin de reducir la concentración de SDS a 0.1%. La preparación así obtenida se incubó con un anticuerpo específico contra TLS (BD Biosciences) durante toda la noche a 4°C y en agitación orbital. Los complejos proteína-ADN tras su incubación durante 2,5 horas a temperatura ambiente con bolas magnéticas unidas a proteínas A y G (Invitrogen) se recogieron sobre un soporte acoplado a un imán. Seguidamente el inmunoprecipitado se incubó 5 horas a 65°C con el fin de revertir las uniones proteína-ADN. La proteína fue degradada con proteasa K y tras purificar el ADN con fenól/cloroformo, éste se precipita con etanol en presencia de glicógeno, se lava, se resuspende en agua y se analiza por qPCR, utilizando los oligonucleótidos que se indican en la Tabla 2. La señal obtenida para la región codificante de la β -actina se utilizará como control negativo de enriquecimiento. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:



■ Ensayos de interacción entre proteínas *in vitro*

Se realizó siguiendo el protocolo descrito en (Olmos et al, 2009). Las proteínas de fusión GST-PGC-1 α -CTD y GST-TLS (GST, Glutathion S-transferasa) se produjeron en la cepa de *E.coli* BL21DE3 tras inducción por isopropil- α -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 3 horas y se purificaron mediante cromatografía en columnas de afinidad de glutathion-agarosa (Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para generar las proteínas TLS(1-525), TLS-NTD (1-275), TLS-CTD (269-525), PGC-1 α (1-797), PGC-1 α - Δ CTD (Δ 564-797), PGC-1 α - Δ SR (Δ 564-634), PGC-1 α - Δ RRM (Δ 677-710), PGC-1 α - Δ SR/ Δ RRM (Δ 564-710), fueron generadas y marcadas mediante transcripción/traducción *in vitro* en presencia de metionina-[S³⁵] utilizando el sistema de transcripción y traducción acopladas *in vitro* TNT[®] de Promega. La transcripción ocurre a partir del promotor T7 presente en el vector de expresión correspondiente. Las proteínas marcadas radiactivamente con S³⁵ se incubaron con 1 μ g de las proteínas de fusión unidas a GST previamente inmovilizadas sobre bolas de glutathion-agarosa. La mezcla se incubó 1 hora a temperatura ambiente en tampón de unión (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10%; glicerol; 5 mM MgCl₂; 0.5 mM EDTA; 0.5 mM EGTA; 2 mM ditiotreitól; 0.1-0.4% NP-40; 100 mM KCl). Tras tres lavados con el tampón de unión, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles SDS-PAGE y visualizadas mediante autorradiografía tal y como se describe en Olmos et al, 2009).

Anticuerpo anti-	Origen	Proveedor	Dilución empleada	
			WB	IP
β-actina	Ratón	Sigma	1:5000	
Catalasa	Conejo	Chemicon International	1:5000	
Cyt C	Conejo	BD Pharmingen	1:5000	
Flag				25 ul
HA-II agarose beads		BabCo		25ul
MCAD	Conejo		1:1000	
MnSOD	Conejo	Stressgen	1:10000	
PGC-1α	Conejo	Santa Cruz (H-300)	1:1000	1:100
		Cayman Chemical	1:1000	1:100
Prx3	Conejo	LabFrontier	1:2000	
Prx5	Conejo	Santa Cruz (FL-214)	1:2000	
TLS	Conejo	Novus	1:30000	1:3000
Trx2	Conejo	LabFrontier	1:1000	
TrxR2	Conejo	LabFrontier	1:500	
UCP-2	Conejo	BioLegend	1:1000	

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para inmunodetección (WB) e inmunoprecipitación de proteínas (IP).

Anticuerpo	Origen	Proveedor	Dilución empleada
HRP-IgG de ratón	Oveja	GE-Healthcare	1:4000
HRP-IgG de conejo	Burro	GE-Healthcare	1:4000
Alexa Fluor 488 cabra anti conejo IgG (H+L)	Cabra	M.P	1:500

Tabla 5. Anticuerpos secundarios empleados para inmunodetección (WB), inmunoprecipitación de proteínas (IP), e inmunofluorescencia

TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS

Las transfecciones de ADN se realizaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en células a un 60-70 % de confluencia. Para ello, se prepararon diluciones de ADN y de Lipofectamina 2000 en medio Opti-MEM I (Invitrogen) sin SFB. Después de 5 minutos de incubación, se mezclaron ambas diluciones y tras una agitación suave se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de ADN-Lipofectamina (relación 1 µg: 2µl). A continuación se añadió la mezcla con los complejos a las células en el medio sin antibiótico. Tras una incubación de 6 horas a 37° C, las células se lavaron con PBS y se añadió medio RPMI completo. Las células se recogieron para su posterior análisis transcurrido entre 24-48 horas desde la transfección.

ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

Para llevar a cabo las determinaciones de actividad luciferasa presente en los extractos celulares se empleó el sistema *Luciferase Reporter Assay System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó transcurridas 24 horas desde la transfección de los plásmidos correspondientes en un luminómetro Orion Microplate (Berthold Detection Systems).

Para normalizar la expresión de la actividad luciferasa, se determinó la cantidad de ADN plasmídico transfectado mediante análisis con qPCR.

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS

Para inducir la muerte celular por apoptosis, las células fueron tratadas con 150 μ M de H₂O₂ (Peróxido de hidrógeno) durante 6 horas. A continuación, se aislaron los extractos celulares y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, con un sustrato fluorescente de la Caspasa-3: Ac-DEVD-AMC (Pharmingen) en una placa de 96 pocillos, a una concentración final de 20 μ M. El producto fluorescente resultante de la degradación proteolítica fue detectado en un fluorímetro: FLuoroscanner Ascent (Thermo Labsystems) como se describe en Valle et al, 2005.

DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Para inducir la producción de ROS mitocondriales se utilizó el compuesto 2,3-Dimetoxi-1-naftoquinona (DMNQ), (calbiochem) que actúa bloqueando la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Las células se incubaron durante 2,5 horas a 37°C con 20 μ M de DMNQ, añadido directamente al medio de cultivo.

La cuantificación del nivel intracelular de **ROS** se realizó por dos métodos:

Microscopía Confocal:

Se utilizó la sonda MitoSOX™ (*Red mitochondrial superoxide indicator for live-cell, imaging*, Molecular Probes) que reacciona con el anión superóxido presente en la mitocondria. Para ello, las células se cultivaron sobre cubreobjetos de cristal, *WillCo-dish Glass Bottom dish* (WillCo Wells Bv) y se incubaron con 5 μ M de MitoSOX™ durante 10 minutos a 37°C, en oscuridad, a continuación, se lavaron las células con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 3%. Tras lavar y montar los cubreobjetos con una solución de inclusión de polivinilalcohol (Mowiol) con Dabco sobre portaobjetos *Menzel Gläser Superfrost®* de Thermo Scientific, se adquirieron las imágenes mediante microscopía de confocal en el microscopio confocal SPE de Leica 4-laser-line upright confocal with transmission detector. La cuantificación de la concentración de ROS mitocondriales se llevó a cabo mediante el análisis de la intensidad media de fluorescencia con el programa de análisis *LAS AF lite_2.0.2* de Leica Microsystems.

Citometría de flujo:

Para la determinación de superóxido mitocondrial: las células se incubaron con la sonda MitoSOX™ a una concentración de 5 μ M, diluido en el medio de cultivo, durante 10 min a 37°C; a continuación las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 453 g durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS para posteriormente medir la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo en el citómetro FACSCanto II de Becton Dickinson. La cuantificación de la concentración de los ROS mitocondriales se llevó a cabo mediante el análisis de la intensidad media de fluorescencia con el programa de análisis *BD FACSDiva* (Becton Dickinson).

La determinación de ROS totales se llevó a cabo a través del marcaje con la sonda fluorescente 5-clorometil-2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester (CM-H₂DCFDA, Molecular Probes) a una concentración de 4 μ M, diluido en el medio de cultivo, durante 30 min a 37°C; a continuación las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 453 g durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS para posteriormente medir la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo en el citómetro FACSCanto II de Becton Dickinson. La cuantificación de la concentración de los ROS totales presentes en la célula se realizó mediante el análisis de la intensidad media de fluorescencia con el programa de análisis *BD FACSDiva* (Becton Dickinson).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD CATALASA Y SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La actividad Catalasa y SOD se evaluó a través del sistema Catalase Assay Kit (Cat. No. 219265 de Calbiochem) y Superoxide Dismutase Assay Kit II (Cat. No. 574601 de Calbiochem) respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. La medida de la fluorescencia se llevó a cabo en un fluorímetro: FLuoroscan Ascent (Thermo Labsystems).

INMUNOFLUORESCENCIA

Los hepatocitos PGC-1 α ^{+/+} y PGC-1 α ^{-/-} cultivados y fijados sobre cubreobjetos de cristal se incubaron con una dilución 1:3000 del anticuerpo primario frente a TLS (Tabla 2) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS y se realizó una nueva incubación con una dilución de trabajo 1:500 del anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 cabra anti conejo IgG (H+L). El marcaje de los núcleos se realizó incubando las muestras con una dilución 1:1000 del fluorocromo de cianina To-Pro3 (invitrogen) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente los cubreobjetos se montaron en los portaobjetos con una solución de montaje Mowiol-Dabco y se sellaron con esmalte de uñas.

La visualización de las muestras se realizó en un microscopio de Epifluorescencia Nikon Eclipse Ti-E de Nikon. La captura y análisis de las imágenes se realizó con el programa Nikon NIS reprocessing e Image J respectivamente.

ISQUEMIA REPERFUSIÓN HEPÁTICA

Anestesia

El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo bajo anestesia inhalatoria con isoflurano. La inducción anestésica se realizó con isoflurano al 5% con un flujo de oxígeno de 1,5 l/min, y se mantuvo durante toda la operación con isoflurano al 1,5-2% con flujo constante de oxígeno.

Cirugía

Una vez inducida la anestesia en el animal, se rasuró el abdomen, se colocó en posición *decúbito supino* sobre una placa térmica, a 37°C, en la mesa de operaciones y se inmovilizó. Previo lavado del abdomen con povidona iodada, se realizó una laparotomía longitudinal aproximadamente 1-2 cm por debajo del apéndice xifoides. A continuación se procedió a realizar el procedimiento de isquemia, que consiste en la oclusión de la arteria hepática y la vena porta con una micropinza o *microclamp* microvascular. Por la anatomía del ratón la arteria y la vena son muy difíciles de separar y se comprimen juntas. A continuación se retira el *microclamp*, restituyendo el flujo sanguíneo en el hígado (**Fig. 4A y B**).

Para finalizar la intervención quirúrgica se suturó la herida del animal con sutura continua de la capa muscular y con sutura discontinua, de la epidermis, con seda 2/0 (Suturas Aragón). A continuación se aplicó povidona iodada a la zona afectada. Los animales se mantuvieron en observación hasta que despertaron y recuperaron el ritmo cardíaco fisiológico y la temperatura corporal. A continuación se le administró analgesia por vía subcutánea (buprenorfina 0,1 µg/g de peso del animal) y se mantuvo al animal hasta sacrificio permitiéndoles el acceso *ad libitum* de agua y comida.

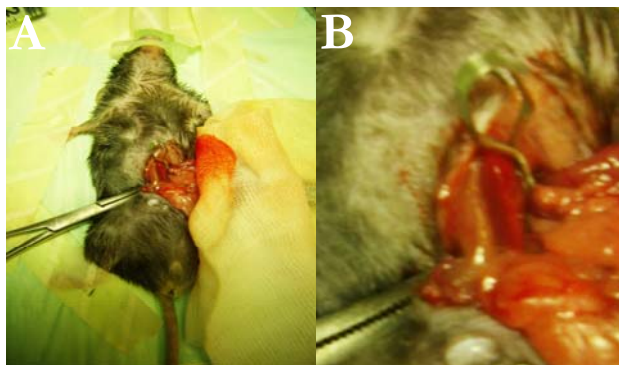


Figura 4. (A) Fase de isquemia por oclusión de la vena porta y la arteria hepática con un microclamp vascular. (B) imagen ampliada.

● Grupos experimentales

Todos los animales fueron sometidos a anestesia, laparotomía longitudinal, y se les dispensó suero salino en el interior de la cavidad peritoneal. Los tiempos de cirugía y anestesia fueron los mismos en todos los grupos

- **Control:** (n=10, PGC1 α ^{+/+}; n=6, PGC1 α ^{-/-}; n=8, HE).
- **IR (ratón sometido a un proceso de isquemia-reperfusión):** (n=10, PGC1 α ^{+/+}; n=6, PGC1 α ^{-/-}; n=8 HE). Los animales fueron sometidos a anestesia, laparotomía longitudinal, y oclusión de la arteria hepática y vena porta durante 30 minutos.
- **PC+ IR (ratón sometido a proceso de preconditionamiento isquémico seguido de isquemia-reperfusión):** (n=10, PGC1 α ^{+/+}; n=6, PGC1 α ^{-/-}; n=8 HE). Los animales fueron sometidos a anestesia, laparotomía longitudinal, y oclusión de la arteria hepática y vena porta durante 5 minutos seguidos de 10 minutos de perfusión (precondicionamiento isquémico) y a continuación se realizó una segunda oclusión la arteria hepática y vena porta 30 minutos).

Se recogieron muestras de sangre y de hígado a las 4 h, 6h, 24h y 1 semana tras la cirugía, de todos los grupos experimentales.

● Procesamiento y análisis histológico de las muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena cava caudal, depositadas en tubos heparinizados (SARSTEDT) y se centrifugaron, durante 10 min a 800 g a 4°C, para obtener el plasma.

La fracción plasmática se utilizó para la determinación de la actividad plasmática de transaminasas hepáticas, utilizada como parámetro indicador de la lesión hepática:

- ✿ **ALT o GPT** (Alanina amino transferasa o *Glutamate Pyruvate Transaminase*). Su elevación en plasma es característica de patologías hepatobiliares.
- ✿ **AST o GOT** (Aspartato amino transferasa o *Glutamyl Oxaloacetic Transaminase*). Su elevación en plasma puede estar asociada a daño muscular cardíaco o esquelético además de la afectación específica del parénquima hepático.

La determinación de la actividad de la GPT y GOT se llevó a cabo a través de la medida de la actividad cinética de la GPT (referencia: GN 41125, Gernon) y de la GOT (referencia: GN 40125, Gernon), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras del tejido hepático se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a – 80°C hasta su posterior procesamiento.

Para la obtención de extractos de proteína total, las muestras de tejido hepático, previamente congeladas, se homogenizaron en presencia de 1 ml de solución de lisis para extractos totales, descrita

previamente, en un homogenizador *ultra-Turrax T25, Janke y Kunkel IKA®-Labortechnik*. La muestra, una vez lisada, se procesó siguiendo el protocolo anteriormente descrito para proteínas celulares

Para la extracción de ARN, las muestras de tejido hepático, previamente congeladas, se homogenizaron en presencia de 1 ml de Trizol. Una vez lisado el tejido, se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C, para eliminar el material insoluble. La extracción, cuantificación y análisis del ARNm se realizó según se ha descrito previamente.

Inclusión de tejidos en parafina, corte en microtomo y tinción hematoxilina-eosina

Las muestras de tejido hepático se fijaron en formol tamponado al 10% durante toda la noche. Al día siguiente se deshidrataron las muestras en soluciones de etanol en porcentajes crecientes y finalmente en xilol. Una vez deshidratadas, se incluyeron en parafina en un procesador de muestras (Leica ASP300); los bloques se montaron en la estación de parafina (Leica EG1150C). Posteriormente se realizaron cortes seriados en secciones de 4-5 µm en el microtomo (Leica RM2155) que se colocaron en portaobjetos polarizados.

Para evaluar la lesión hepática se llevó a cabo la tinción con hematoxilina-eosina que se realizó con el sistema *Leica Multistainer ST5020*. Las muestras se montaron y se visualizaron en un microscopio Nikon 90i y las imágenes se adquirieron con una cámara acoplada al microscopio. El programa de captura de imágenes fue y el del procesamiento Adobe Photoshop.

Inclusión de tejidos por congelación y corte en criostato

Las muestras de tejido hepático se fijaron en 4% de PFA durante toda la noche. Al día siguiente, fragmentos del tejido de 1cm se incluyeron en el reactivo OCT™ (*Optimal Cutting Temperature*) (Tissue Tek) que ayuda a mantener la estructura del tejido y se sometieron a congelación rápida en nieve carbónica. Se hicieron cortes seriados en secciones de 4-6 µm con un criostato motorizado (Leica CM1850) que se montaron sobre portaobjetos polarizados *Superfrost®Plus* (Menzel Gläser).

Tanto las muestras parafinadas como las incluídas en OCT se almacenaron a -80° C hasta su procesamiento.

Detección de células apoptóticas

La detección de la acumulación de células apoptóticas en el tejido, se llevó a cabo mediante el método TUNEL. Esta técnica permite detectar el tipo de fragmentación nuclear del ADN que tiene lugar tras la apoptosis (Gavrieli et al, 1992).

Los portaobjetos con las secciones se descongelaron a temperatura ambiente y se marcaron con el sistema *in situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez finalizado el marcaje se depositó una gota de medio de montaje Mowiol-Dabco y se cubrió con un cubreobjetos de 24x60 mm (Menzel Gläser).

Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal espectral, de leica Microsystems, con escáner resonante, montado sobre microscopio invertido DMI 6000B, equipado con un láser de argón con 5 líneas de excitación (456, 476, 488, 496, 514nm), láser diodo de 561nm, láser diodo de 594nm, láser diodo de 633nm y un láser diodo azul (405nm) capaz de excitar DAPI. El programa de captura de imágenes fue *LAS AF lite* de Leica y el de procesamiento Image J y Adobe Photoshop.

MODELO EXPERIMENTAL DE HIPOXIA-REOXIGENACIÓN “IN VITRO”

Se utilizaron hepatocitos primarios de ratón que fueron aislados y cultivados según se ha descrito previamente. Se mantuvieron en un incubador de hipoxia a una concentración de oxígeno del 3%. Posteriormente las placas de cultivo se introdujeron en cámaras de hipoxia (Ruskin in vivo₂ 400) que permiten controlar la tensión oxígeno y el dióxido de carbono.

Condiciones experimentales:

- ❖ **Control:** Las células se mantuvieron en un incubador al 3% de tensión de O₂ y 5% de CO₂ durante todo el periodo experimental.
- ❖ **Hipoxia** Las células se mantuvieron en una cámara de hipoxia al 3% de O₂ y 5% de CO₂ durante 24 horas, transcurrido ese tiempo se mantuvieron en 1% de O₂ hasta el momento de ser recogidas.
- ❖ **Hipoxia-Reoxigenación:** Las células se mantuvieron en una cámara de hipoxia al 3% de O₂ y 5% de CO₂ durante 24 horas, transcurrido ese tiempo se mantuvieron en 1% de O₂ durante 14 horas, seguidamente se restableció la tensión de oxígeno del 3% durante 6 h, momento en el que se recogieron las células.

APLICACIONES INFORMÁTICAS

- ✿ Primer Express (<http://www.appliedbiosystems.com>): diseño de oligos.
- ✿ ADNSTAR Lasergene (<http://www.ADNstar.com>): (Blattner & Schroeder, 1984) diseño de oligos y análisis de secuencias.
- ✿ Ingenuity (<http://www.ingenuity.com/index.html>): Análisis funcional genético del array.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el test de Student (t-test), el análisis de la varianza (ANOVA) o test no paramétricos, según los casos. Los valores de probabilidad (p) iguales o inferiores a 0,05 fueron considerados como estadísticamente significativos. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces de forma independent

RESULTADOS

**Capítulo I: PGC-1 α regula la
actividad transcripcional de TLS
sobre el sistema de protección frente
a estrés oxidativo mitocondrial**

TLS interacciona con PGC-1 α

PGC-1 α es un regulador maestro del metabolismo oxidativo y de la función mitocondrial (Handschin, 2009) que regula la expresión de un grupo de genes implicados en la protección frente al estrés oxidativo (Valle et al, 2005). En el hígado, la función fisiológica de PGC-1 α está especialmente bien caracterizada, regula el metabolismo celular induciendo en condiciones de ayuno la activación de diferentes rutas metabólicas implicadas en la obtención de energía (Puigserver et al, 2003; Shin et al, 2003; Li et al, 2007; Speckmann et al, 2008).

Para investigar la posible interacción entre el sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial, regulado por PGC-1 α y los mecanismos que controlan la respuesta al daño genotóxico, se realizó, un ensayo de doble híbrido en levaduras, utilizando como “cebo” la región carboxilo terminal de PGC-1 α (CTD) que comprende entre los aminoácidos (aa) 580-797 y que contiene un dominio regulador de la actividad de PGC-1 α en el que se han mapeado sitios de interacción para varios factores de transcripción, así como, residuos susceptibles de modificación por fosforilación y un motivo de unión a ARN. El “screening” se realizó contra una librería de ADNc humana. Se obtuvieron 32 clones positivos, de los cuales tres, correspondían a la proteína TLS. TLS es un regulador de la expresión génica a varios niveles, con capacidad de funcionar como coactivador y corepresor transcripcional (Hallier et al, 1998; Powers et al, 1998; Uranishi et al, 2001; Wang et al, 2008). A nivel funcional, se ha descrito como una proteína implicada en la respuesta celular frente al daño genotóxico (Kuroda et al, 2000). Por todo ello decidimos estudiar la relación funcional entre TLS y PGC-1 α .

Con el fin de mapear las regiones de interacción entre PGC-1 α y TLS se realizaron ensayos de interacción entre proteínas *in vitro* del tipo “GST pull down”. Empezamos por testar la interacción de la proteína de fusión GST-TLS, con PGC-1 α o con varios mutantes de delección de PGC-1 α en el dominio CTD, todos ellos marcados radiactivamente y generados mediante transcripción-traducción *in vitro* (IVT). La estructura secundaria de PGC-1 α y de los diferentes mutantes aparece descrita en la figura 5A. Los resultados obtenidos indican que TLS interacciona directamente con PGC-1 α y con los mutantes Δ RRM (Δ 677-710), Δ SR (Δ 564-634) y Δ SR/ Δ RRM (Δ 564-710), pero no con PGC-1 α - Δ CTD (1-564), indicando que esta interacción no requiere ni de la región de unión a ARN (RRM), ni la región rica en serinas y argininas (SR) sugiriendo que la interacción se produce probablemente a través de la región 710-797. (Fig. 5C).

Para identificar la región de TLS que interacciona con PGC-1 α -CTD, se utilizaron de nuevo el mismo tipo de ensayos de “GST pull down” en los que se testó la interacción de la proteína de fusión GST-PGC-1 α -CTD (Olmos et al, 2009) con TLS y con una serie de mutantes de la zona C-terminales de la proteína. La estructura secundaria de TLS y de los diferentes mutantes aparecen descritos en la figura 5B. Observándose que la delección de los 50 aa C-terminales (aa1-471) era suficiente para suprimir la capacidad de TLS de interaccionar con PGC-1 α (Fig. 5D). Esta región corresponde a la zona rica en tripletes de de Arg-Gly-Gly (RGG3) para la que se había propuesto previamente, que participaba en la especificidad de la unión

al ARN (Burd & Dreyfuss, 1994; Lerga et al, 2001), así como mediadora de las interacciones proteína-proteína (Cartegni et al, 1996; Bouvet et al, 1998).

Con el fin de comprobar que la pérdida de la interacción no era debida a una desestabilización de la proteína, se generaron dos fragmentos complementarios correspondientes a los dominio N-terminal (TLS-NTD) (aa 1-275) y C-terminal (TLS-CTD) (aa 269-525) de TLS y se testó su capacidad para interactuar con PGC-1 α -CTD, observándose que PGC-1 α -CTD era capaz de interactuar con TLS-CTD pero no con la región TLS-NTD, lo que confirmaba que la interacción se produce a través de la región C-terminal (Fig. 5D).

Para determinar si, la interacción de PGC-1 α con TLS tiene lugar en el contexto celular, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación (coIP) en células 293T que fueron transfectadas con vectores de expresión para la proteína TLS unida al péptido Flag para PGC-1 α y los mutantes de PGC-1 α , fusionados a tres copias del péptido HA. Se inmunoprecipitó PGC-1 α y los mutantes con un anticuerpo monoclonal contra el péptido HA y se analizó la presencia de TLS en el inmunoprecipitado. Al igual que en los ensayos “GST-pull down” se observó que, TLS coimmunoprecipitaba con la proteína completa y con los mutantes Δ RRM (Δ 677-710), Δ SR (Δ 564-634) y Δ SR/ Δ RRM (Δ 564-710), pero no junto con el mutante Δ CTD (1-564), lo que confirma la hipótesis de que TLS interactúa con PGC-1 α a través de la región correspondiente a los aa 710-797 y que esta interacción ocurre en el contexto celular (Fig. 6A). Finalmente, para comprobar si la interacción ocurría de manera natural en las células, se realizó un ensayo de coIP en extractos totales provenientes de hepatocitos primarios de ratón, en los que se inmunoprecipitó PGC-1 α , con un anticuerpo específico y se analizó la presencia de TLS en el inmunoprecipitado por WB. Observando que efectivamente TLS aparecía enriquecido en las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico contra PGC-1 α (Fig. 6B), lo que confirma que PGC-1 α y TLS se encuentran formando un complejo de forma natural en los hepatocitos.

Estructura Secundaria de PGC-1 α y mutantes

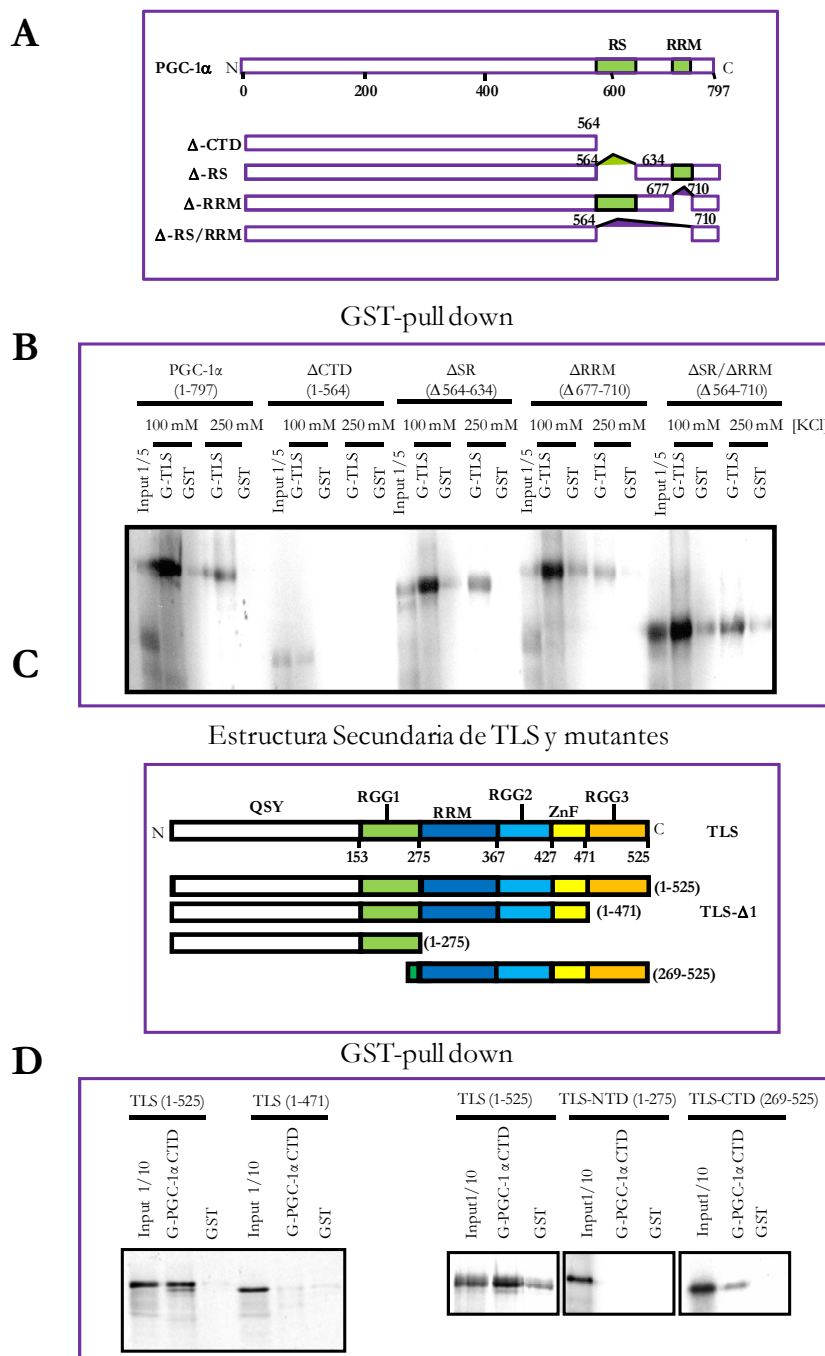


Figura 5. Mapeo de las regiones de interacción entre PGC-1 α y TLS. (A, C) Estructura secundaria de PGC-1 α (A), TLS (C) y de los mutantes utilizados en este estudio. (B,D) “GST-pull down”. 1 μ g de la proteína de fusión GST-TLS (B) GST-PGC-1 α -CTD (D) fue inmovilizada en una matriz de glutatión e incubada con las variantes indicadas de PGC-1 α (B) y de TLS (D) que fueron producidas in vitro (IVT) y marcadas con [35 S]-Met. La proteína unida a la matriz fue sometida a electroforesis en geles SDS-PAGE y revelada por autoradiografía.

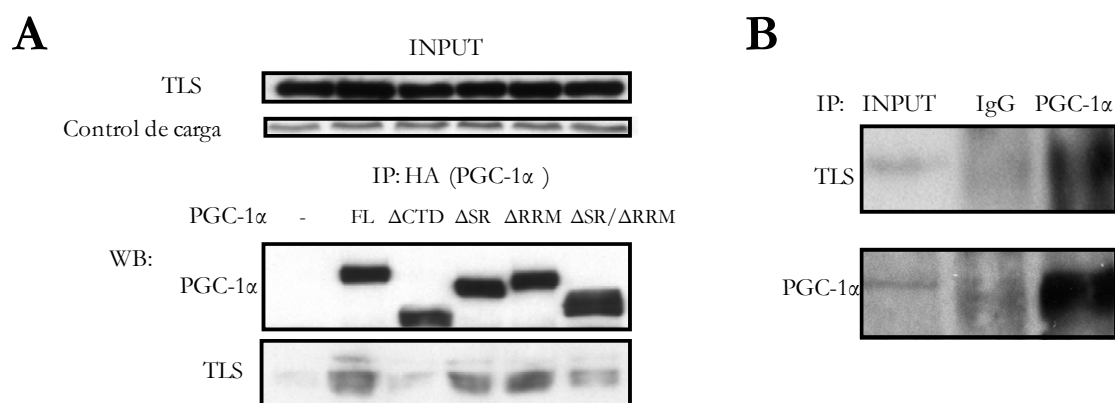


Figura 6. Interacción entre PGC-1α y TLS en células. (A) Las células 293T fueron co-transfectadas con vectores de expresión para la proteína TLS unida al péptido Flag y para PGC-1α, o los mutantes de la proteína PGC-1α unidas a la hemaglutinina (HA). Se inmunoprecipitó PGC-1α con un anticuerpo monoclonal anti-HA, y se analizó la presencia de TLS en el inmunoprecipitado mediante western blot. (B) Extractos totales de hepatocitos primarios de ratón fueron utilizados para inmunoprecipitar PGC-1α con un anticuerpo específico. La presencia de TLS en el inmunoprecipitado fue analizada por western blot. F.L (proteína completa del inglés *full-length*).

TLS regula la actividad transcripcional de PGC-1α

Con el objeto de determinar si TLS regula directamente la actividad transcripcional de PGC-1α, se realizó un experimento de actividad transcripcional mediante transfección transitoria con gen reportero, también denominado de doble híbrido en mamíferos. Para ello, se utilizó un vector de expresión para la proteína PGC-1α fusionada al dominio de unión de la proteína Gal4 de levaduras. Este dominio dirige el reclutamiento de la proteína a 5 sitios UAS clonados en tándem en la región promotora del gen reportero de la luciferasa. Este plásmido fue transfectado en las células MEF TLS^{+/+} y TLS^{-/-} observándose que la actividad transcripcional de PGC-1α era menor en MEF TLS^{-/-} que en MEF TLS^{+/+}, lo que parece indicar que TLS aumenta la actividad transcripcional de PGC-1α (Fig. 7A).

Para comprobar que TLS aumentaba la actividad transcripcional de PGC-1α, mediante su interacción directa con PGC-1α, se realizó un ensayo de rescate de la actividad de PGC-1α sobre células MEF TLS^{-/-} que se cotransfectaron con un vector de expresión para TLS o para el mutante de TLS (TLS-Δ1), que aunque carece de la región de interacción con PGC-1α, tiene todos sus dominios de activación transcripcional intactos junto con el vector de expresión para PGC-1α. Determinándose que, TLS pero no TLS-Δ1 podía aumentar la actividad transcripcional de PGC-1α en las células MEF TLS^{-/-}, lo que apoyaba la hipótesis de que la actividad de TLS sobre PGC-1α, requiere de la interacción directa entre las dos proteínas (Fig. 7B). Para determinar si esta regulación era o no específica del tipo celular se repitió el ensayo en este caso en una línea celular de hepatoma de rata (FAO), obteniéndose el mismo resultado, lo que confirma que TLS es un cofactor de PGC-1α y esta actividad reguladora es independiente del tipo celular (Fig. 7C).

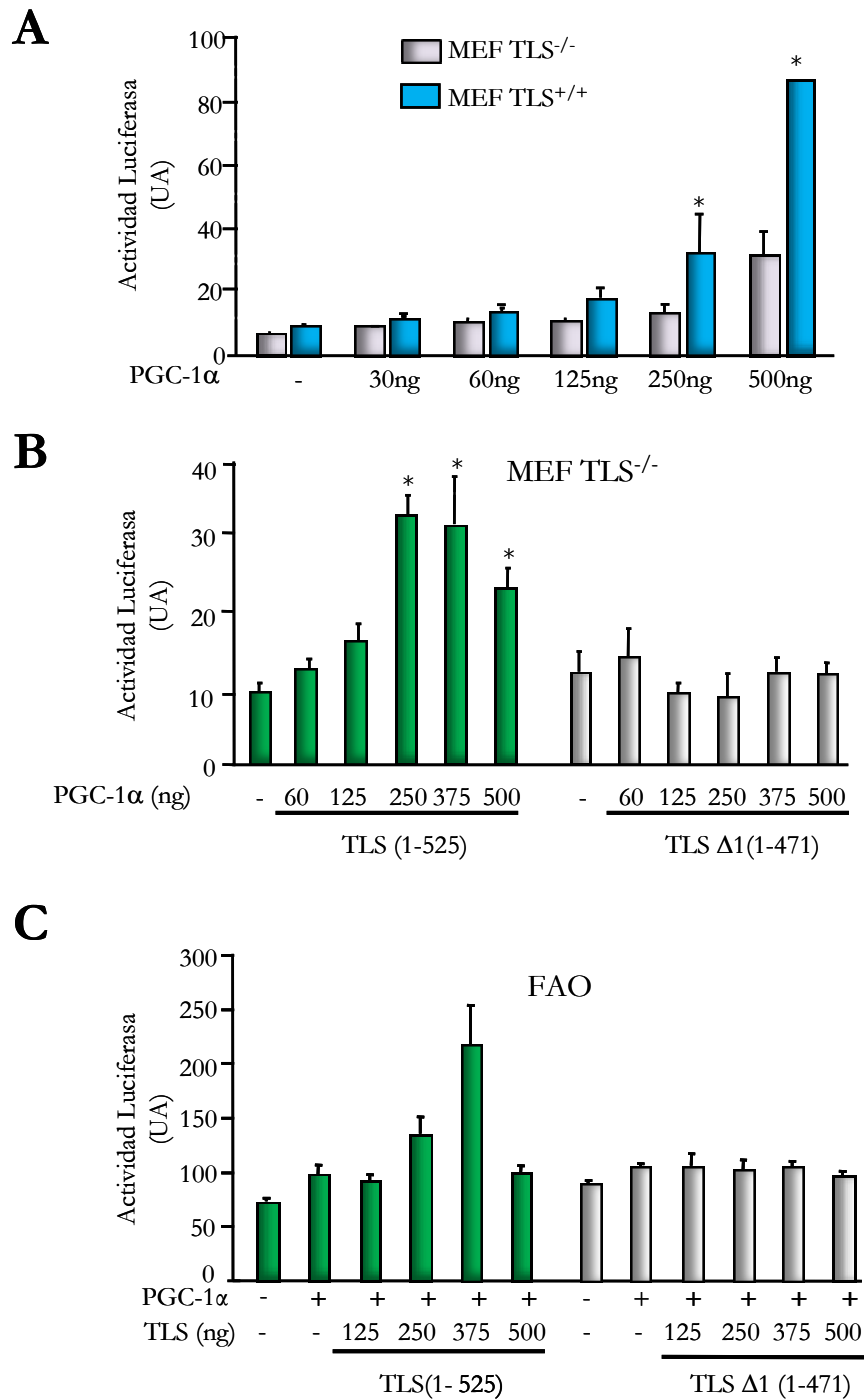


Figura 7. TLS incrementa la actividad transcripcional de PGC-1α. (A) MEF TLS^{+/+} y MEF TLS^{-/-} fueron cotransfectadas con un plásmido portador el gen reportero de la luciferasa bajo el control de un promotor con 5 sitios UAS (5x-UAS-luc) y distintas cantidades de un vector de expresión para la fusión GAL4-DBD-PGC1α. B-C) las células MEF TLS^{-/-} (B) o las células FAO (C) fueron cotransfectadas con el plásmido p5x-UAS-luc con las cantidades indicadas del plásmido pGAL4-DBD-PGC1α y un vector de expresión para TLS wt o el mutante TLSΔ1, que carece de la región de interacción con PGC-1α. (A-C) La actividad luciferasa fue determinada 24 horas después de la transfección. Las gráficas muestran la Media ± desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

PGC-1 α regula el sistema de protección frente a estrés oxidativo de origen mitocondrial en hepatocitos primarios de ratón

El hígado es el órgano central en el control del metabolismo del organismo y en el proceso de detoxificación de todo tipo de sustancias tóxicas provenientes de la ingesta de alimentos. Ambos procesos, hacen del hígado un órgano sometido a altas concentraciones de ROS, por lo que se requiere para el adecuado mantenimiento de su funcionalidad de unos sistemas antioxidantes muy eficientes.

Cuando nos planteamos este trabajo sabíamos que PGC-1 α regulaba la expresión de varios genes implicados en el control y en la eliminación de los ROS mitocondriales (St-Pierre et al, 2003; Valle et al, 2005; St-Pierre et al, 2006), pero no se había descrito que esta regulación ocurriera en el hígado. Lo que si se había descrito era que PGC-1 α tenía un papel fundamental en la regulación del metabolismo hepático ya que PGC-1 α participa en la regulación del catabolismo lipídico en la gluconeogénesis, en la biosíntesis del grupo hemo y en la síntesis de las sales biliares (Handschin, 2009; Li et al, 2009). Por ello decidimos evaluar la capacidad de PGC-1 α de regular el sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial en hepatocitos primarios aislados de ratón. Para ello, por un lado se realizaron ensayos de sobreexpresión de PGC-1 α , utilizando como vector de expresión un adenovirus recombinante, Ad-PGC-1 α y por otro lado se suprimió la expresión de PGC-1 α con un ARN de interferencia (shARN) específico contra PGC-1 α y expresado también por un adenovirus recombinante Ad-shPGC-1 α . Se observó que cuando se sobreexpresa PGC-1 α hay un incremento en la expresión de varios genes implicados en el sistema de detoxificación mitocondrial, como MnSOD, Cat, UCP-2, Prx3, Prx5, Trx2 y TrxR2 (Fig. 8A) y que cuando se suprime la expresión de PGC-1 α hay una disminución generalizada en los niveles de expresión de estos mismos genes (Fig. 8B). Este resultado confirma que la regulación por PGC-1 α de los sistemas antioxidantes ocurre también en células hepáticas.

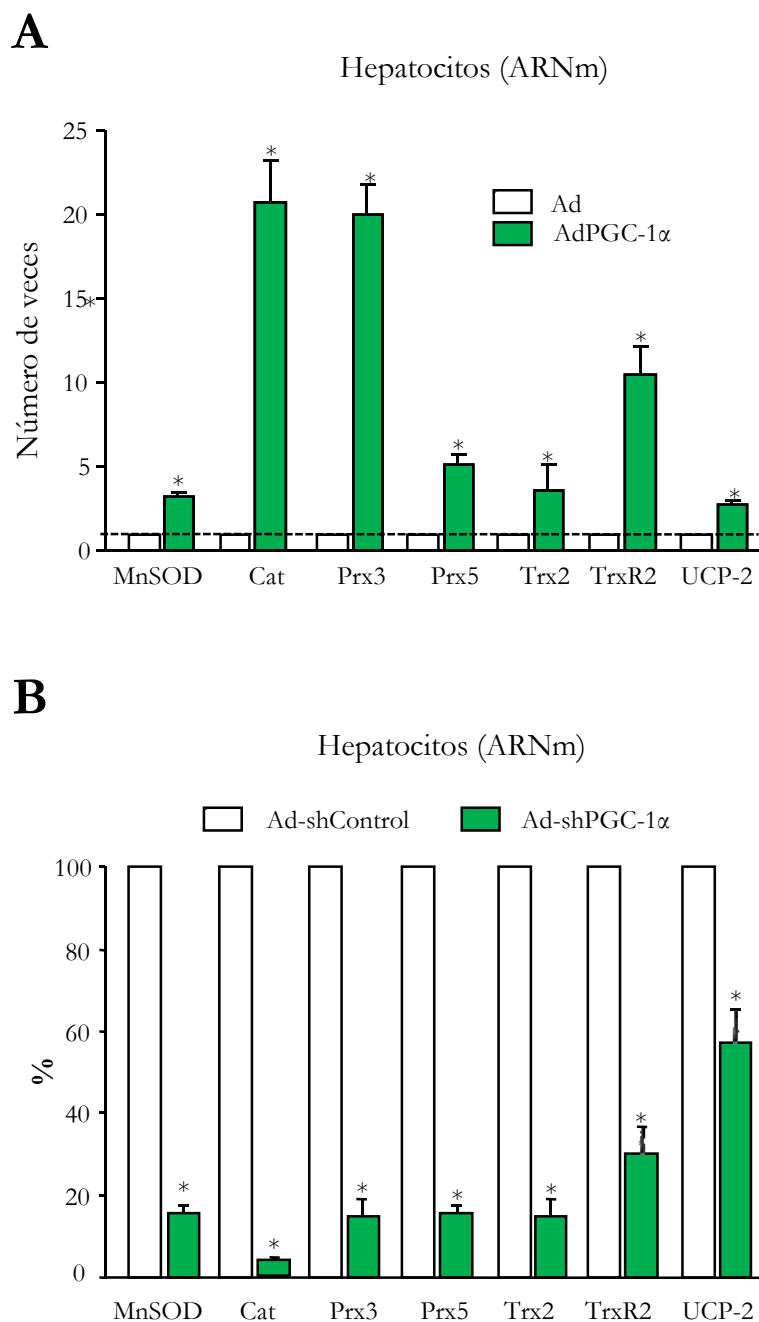


Figura 8. PGC-1 α regula la expresión de genes de protección frente al estrés oxidativo de origen mitocondrial en hepatocitos primarios. (A) Los hepatocitos primarios de ratón que fueron infectados con Ad-PGC-1 α o con un adenovirus control (Ad). **(B)** Los hepatocitos primarios de ratón fueron infectados con el adenovirus Ad-shPGC-1 α o con un adenovirus control (Ad-shControl). **(A-B)** La expresión relativa de los genes indicados fue determinada por qRT-PCR a partir de ARN total, utilizando el ARN de la β -actina como control endógeno. A las muestras de referencia se les asignó el valor de 1. Las gráficas se muestran como la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

TLS regula el sistema de protección frente a estrés oxidativo de origen mitocondrial

Como ya se ha comentado previamente, TLS participa en la respuesta celular frente al daño genotóxico. Teniendo en cuenta que la acumulación de ROS, puede ser uno de los factores implicados en el daño al ADN, se decidió estudiar si TLS al igual que PGC-1 α , podía intervenir en la regulación transcripcional de los genes de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial. Para ello, se infectaron células FAO con un adenovirus recombinante que dirige la expresión de TLS (Ad-T) y un adenovirus control (Ad). El análisis de expresión del ARNm y proteína mostró que TLS induce la expresión de todos los genes analizados del sistema de detoxificación de ROS como MnSOD, Catalasa, Prx3, Prx5, Trx2, TrxR2 y UCP-2 (Fig. 9A y B).

Para comprobar si los genes estudiados, eran regulados directamente por TLS, se llevó a cabo un experimento de inmunoprecipitación de cromatina, utilizando oligonucleótidos dirigidos contra las regiones promotoras de estos genes que mostraban homología con las regiones promotoras de estos mismos genes humanos, para las que se había descrito previamente una asociación con PGC-1 α (Valle et al, 2005). Los resultados muestran que TLS se asocia, al menos con las regiones promotoras de *sod2*, *prx3*, *prx5*, *catalasa* y *ucp-2* (Fig. 9C).

Los resultados obtenidos sugieren que TLS actúa modulando positivamente la expresión de una serie de proteínas implicadas en la defensa frente al estrés oxidativo, incluyendo tanto enzimas que detoxifican los ROS, como la proteína desacoplante UCP-2, que disminuye la producción de O₂⁻ a través de la mitocondria.

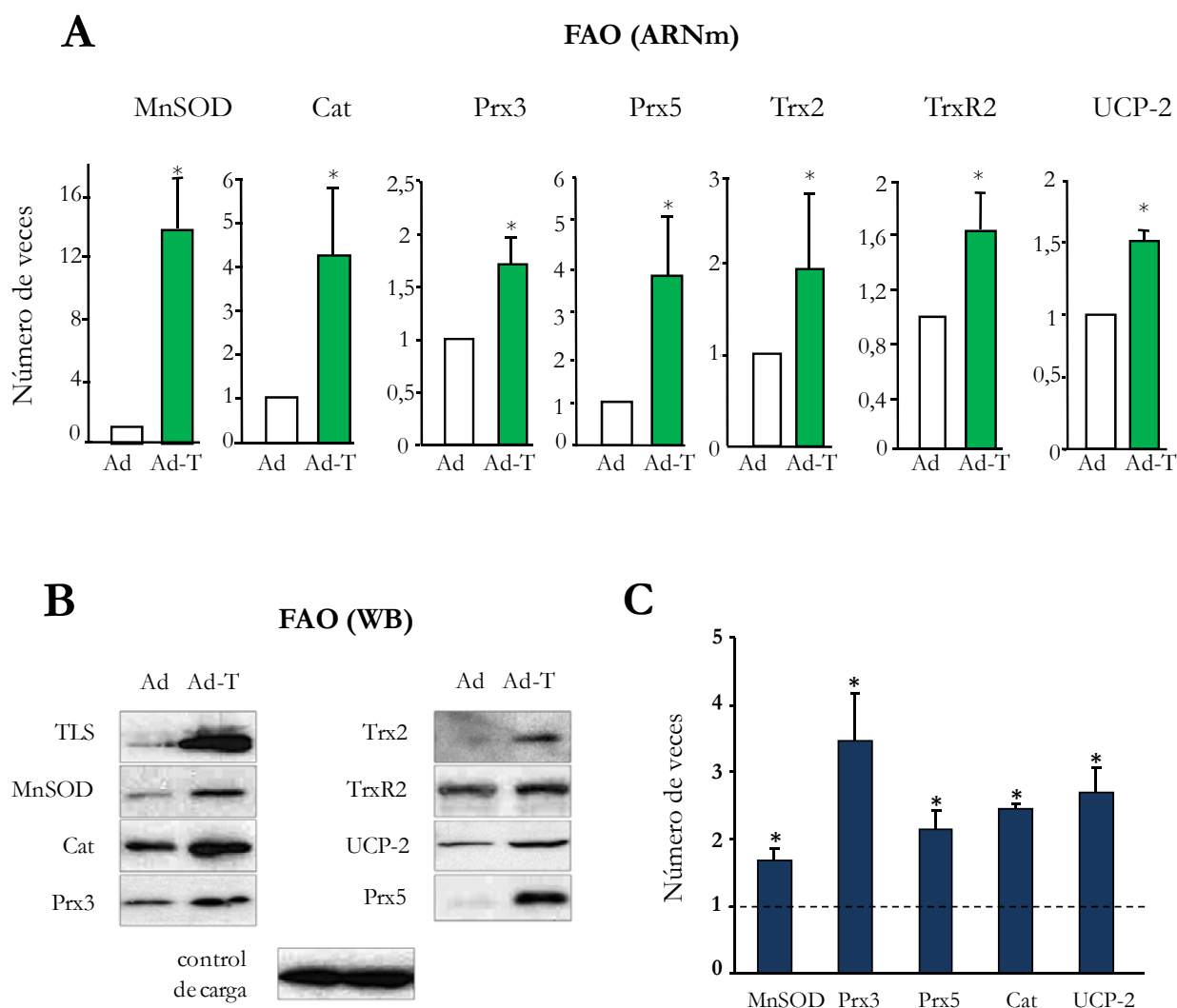


Figura 9. TLS regula la expresión de los genes de protección frente al estrés oxidativo de origen mitocondrial en células FAO. (A-B) Las células FAO se infectaron con Ad-TLS o con un adenovirus control (Ad). **(A)** La expresión relativa de los genes indicados fue determinada por qRT-PCR a partir de ARN total. El ARN18S fue utilizado como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó un valor de expresión 1. **(B)** Análisis por Western Blot. **(C)** La localización de TLS en las regiones promotoras de los genes indicados fue analizada en células FAO mediante un ensayo de ChIP. La secuencia codificante de la β -actina fue utilizada como control negativo. A las muestras de referencia (IgG) se les asignó el valor de 1. **(A, C)** Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

En base a estos datos, decidimos evaluar el impacto de esta regulación sobre los niveles intracelulares de ROS en las células FAO, en las que se sobreexpresó TLS y en las células control. Las células se incubaron con la sonda fluorescente para ROS, CM-H₂DCFDA. Esta sonda reacciona preferentemente con el H₂O₂, pero también con otros ROS presentes en el citoplasma. La señal emitida se evaluó por citometría de flujo. El análisis mostró que la sobreexpresión de TLS disminuye la intensidad de fluorescencia, lo que sugiere una reducción en la acumulación de los ROS totales presentes en las células, probablemente debido a la presencia de unos sistemas de detoxificación más activos (Fig. 10A).

Con el fin de investigar de forma más directa, si la sobreexpresión de TLS incrementa la capacidad de detoxificación celular y reduce la producción mitocondrial de O₂⁻, las células FAO infectadas con Ad-TLS, se trataron con DMNQ, un inhibidor de la cadena de transporte de electrones, que incrementa la producción mitocondrial de O₂⁻ de forma dependiente de dosis y se evaluaron mediante microscopía confocal, los niveles mitocondriales de O₂⁻, con la sonda fluorescente MitoSox, que reacciona con el O₂⁻ mitocondrial, observándose que, en concordancia con los experimentos anteriores, la sobreexpresión de TLS reduce los niveles mitocondriales de ROS (Fig. 10B). Por lo que se puede concluir que TLS reduce los ROS, al menos en parte, debido a que es capaz de incrementar la capacidad de detoxificación celular.

Para confirmar esta hipótesis, se cuantificó directamente la actividad de las enzimas catalasa y SOD, en células FAO infectadas con el Ad-T, los resultados muestran que TLS incrementa la actividad de ambos tipos de enzimas. Por tanto, estos resultados vendrían a apoyar la hipótesis de que TLS es capaz de regular el sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial, disminuyendo la acumulación de ROS e incrementando la capacidad de detoxificación celular (Fig. 10C).

El estrés oxidativo en hepatocitos y en células FAO, induce la muerte celular por apoptosis vía mitocondrial, que implica la activación final de la caspasa 3 (Simbula et al, 2007; Horvathova et al, 2008). Para investigar la importancia de la actividad de TLS en la supervivencia celular, en condiciones de estrés oxidativo, se sobreexpresó TLS en células FAO y se monitorizó la muerte celular por apoptosis inducida por estrés oxidativo (150 µM de H₂O₂) mediante la cuantificación de la actividad caspasa 3, utilizando un sustrato específico fluorescente, Ac-DEVD-AMC. Los resultados obtenidos mostraban que la sobreexpresión de TLS reduce la activación de la caspasa 3 en células FAO tratadas con 150 µM de H₂O₂, lo que sugiere que TLS protege a las células FAO de la apoptosis inducida por H₂O₂, probablemente porque TLS incrementa la capacidad de detoxificación celular (Fig. 10D).

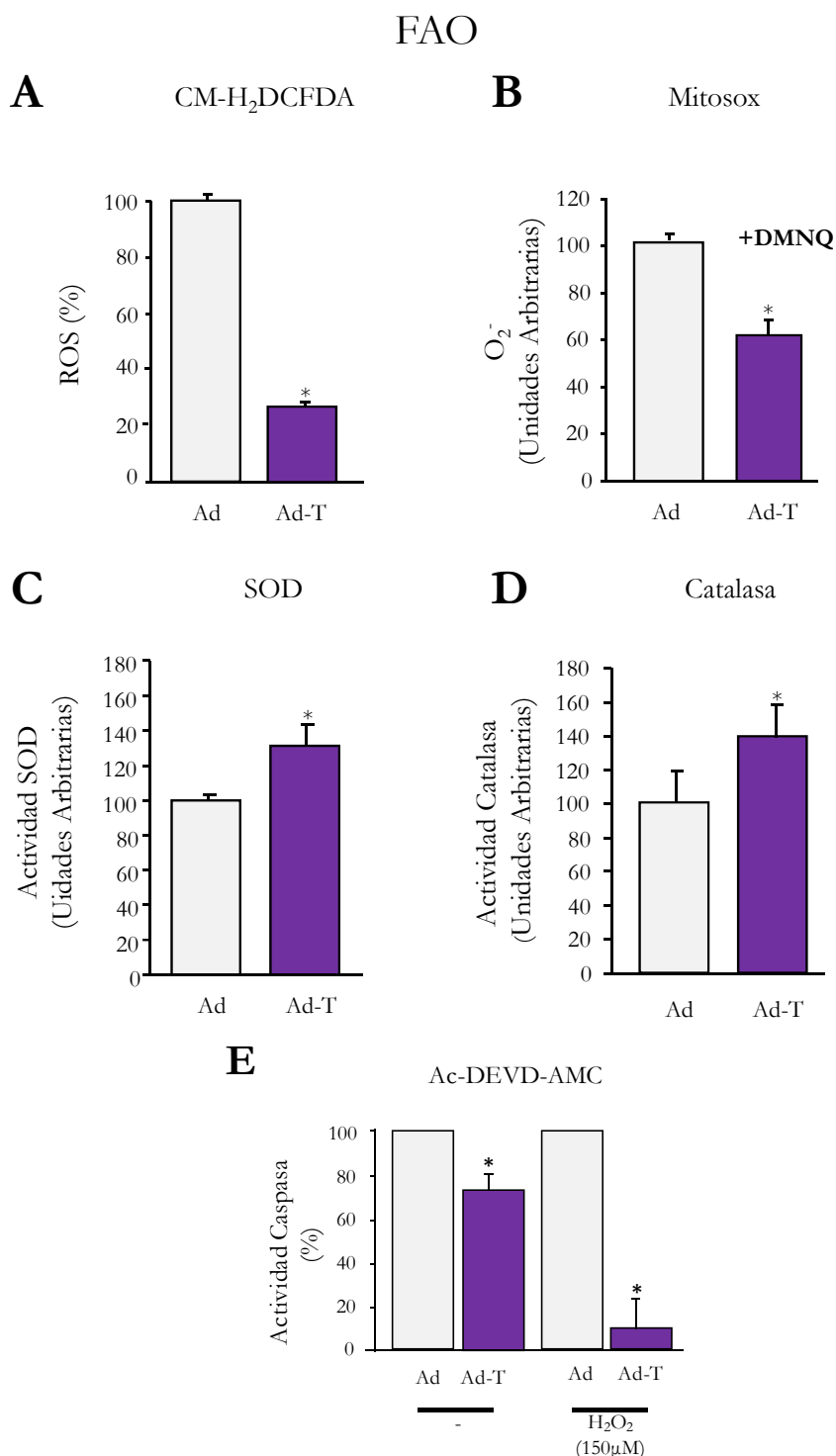


Figura 10. La sobreexpresión de TLS incrementa la capacidad de detoxificación de ROS en células FAO. (A-E) Las células FAO fueron infectadas con Ad-TLS o con un adenovirus control (Ad). **(A)** Determinación de ROS totales. Las células se marcaron con la sonda CM-H₂DCFDA y se analizaron por citometría de flujo. **(B)** Determinación de la capacidad celular de detoxificación de superóxido (O₂⁻). Las células se trataron con 20 μM de DMNQ durante 2,5 horas y se marcaron posteriormente con la sonda MitosoxTM. Las células fijadas se analizaron mediante microscopía confocal. **(C-D)** Determinación de la actividad enzimática de la SOD **(C)** y de la catalasa **(D)** en extractos totales. **(E)** Determinación de la actividad de la caspasa-3 en extractos totales de células tratadas durante 8 horas con 150 μM de H₂O₂. El inhibidor general de la caspasa Z-VAD se utilizó como control negativo. **(A-E)** A las muestras de referencia se les asignó el valor de 100%. Las gráficas muestran la Media ± desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Para confirmar la actividad de TLS sobre los genes del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial, se compararon los niveles de expresión de estos genes en células MEF TLS^{+/+} y TLS^{-/-}, observándose que las células que carecen de TLS, muestran niveles de expresión de ARNm disminuidos de todos los genes analizados (Fig. 11A). Así mismo, el análisis de los niveles de estas proteínas, confirmó que todas ellas se encontraban reducidas en MEF TLS^{-/-}, a excepción de TrxR2, cuyos niveles se encontraron incrementados (Fig. 11B). A la vista de estos resultados se puede concluir que, TLS ejerce una acción reguladora sobre el sistema de detoxificación mitocondrial. Para valorar si esta reducción generalizada en los sistemas de detoxificación mitocondrial se acompañaba de un aumento de los niveles intracelulares de ROS, se determinaron éstos, mediante marcaje con la sonda fluorescente CM-H₂DCFDA y análisis por citometría de flujo. Los resultados obtenidos confirmaron que los niveles de ROS son mayores en células MEF TLS^{-/-} que en células MEF TLS^{+/+} (Fig. 11C).

Los resultados obtenidos se validaron en hepatocitos primarios de ratón, en los que se silenció la expresión de TLS con el adenovirus Ad-shTLS. El análisis de los niveles de expresión de ARNm y de proteína mostró una reducción en los niveles de expresión de todos los genes analizados y una disminución en los niveles de todas las proteínas correspondientes, incluyendo TrxR2, así como, un incremento en los niveles intracelulares de ROS (Fig. 11D, E y F).

Estos resultados, tomados en su conjunto, apoyan la hipótesis de que TLS es un regulador positivo de varios genes antioxidantes y es necesario para el mantenimiento de la expresión basal de los genes de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial.

Una proteína antioxidante debería ser ella misma sensible a los ROS, por tanto, decidimos analizar si la expresión de TLS se veía alterada por agentes metabólicos capaces de inducir estrés oxidativo, como es el caso de altas concentraciones de glucosa (25 mM) o directamente por concentraciones subletales de H₂O₂ (50µM). Observando que, tanto el H₂O₂ como la glucosa inducen la expresión de TLS, lo que apoya la relevancia funcional de TLS en el control de la homeostasis de los ROS (Fig. 12)

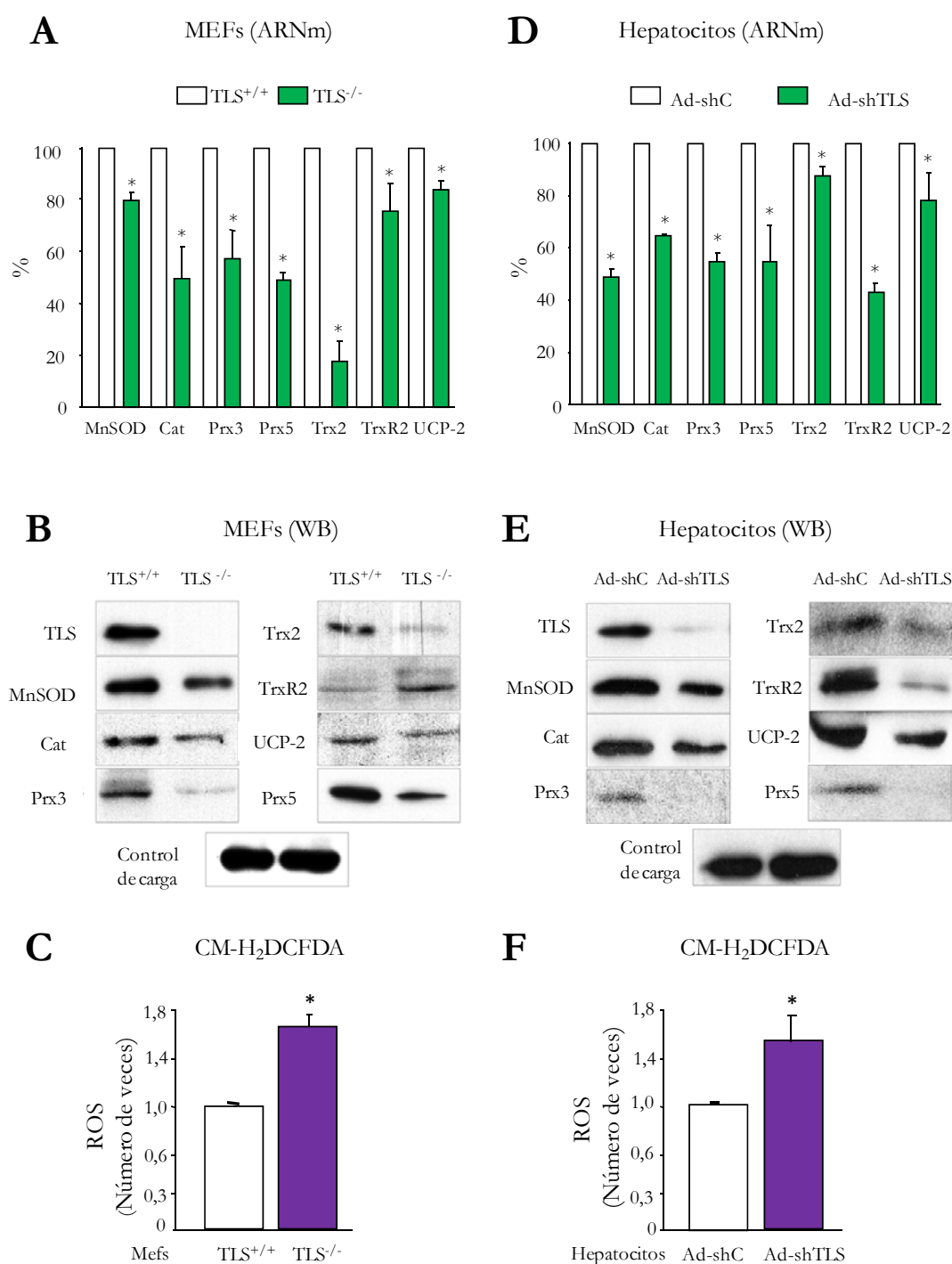


Figura 11. TLS es necesario para mantener los niveles de varias proteínas antioxidantes. (A-C) MEF TLS^{+/+} y TLS^{-/-}. **(D-F)** Hepatocitos primarios de ratón infectados con el adenovirus Ad-shTLS o con un adenovirus control (Ad-shC). **(A, D)** La expresión relativa de los genes indicados fue determinada por qRT-PCR a partir de ARN total. El ARN 18S fue utilizado como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó un valor de 100%. **(B, E)** Análisis por western blott de las proteínas indicadas. **(C, F)** Determinación de ROS totales. Las células se marcaron con la sonda CM-H₂DCFDA, y se analizaron por citometría de flujo. A las muestras de referencia se les asignó el valor de 1. **(A, C, D, F)** Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

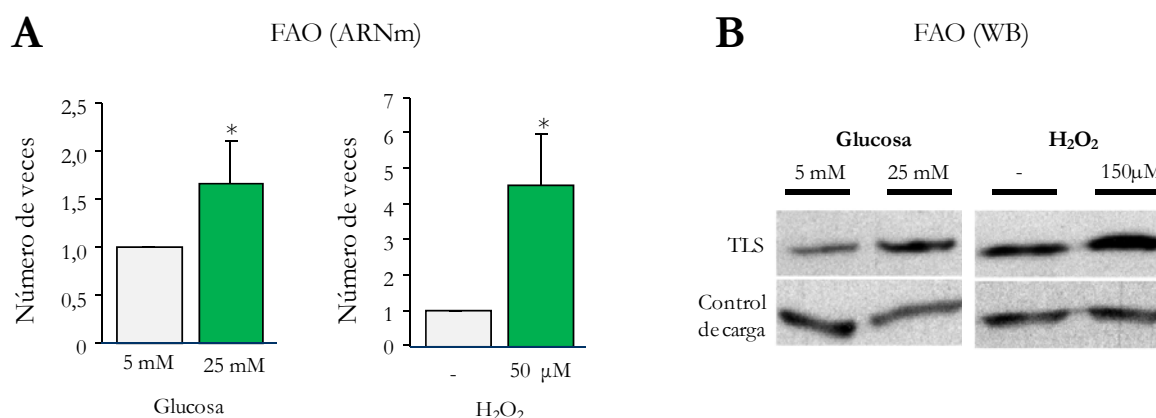


Figura 12. TLS se induce en condiciones de estrés oxidativo. (A-B) las células FAO se trataron con 5 ó 25 mM de glucosa durante 48 horas o con 50 μ M de H₂O₂ durante 4 horas. **(A)** La expresión relativa de TLS fue determinada por qRT-PCR a partir de ARN total. El ARN 18S fue utilizado como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó el valor de 1. **(B)** Los niveles de TLS fueron determinados por Western Blot. La gráfica se muestra como la Media \pm desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$

TLS coopera con PGC-1 α en la regulación de los genes del sistema de protección frente a estrés oxidativo en FAO

Los resultados obtenidos hasta este momento indicaban que TLS actúa como un regulador de la actividad transcripcional de PGC-1 α y que tanto, TLS, como PGC-1 α son capaces de regular un grupo común de genes implicados en la protección frente al estrés oxidativo mitocondrial. Además, los ensayos de ChIP revelaron que esos factores aparecen asociados con las mismas regiones promotoras reguladoras (Fig. 9C) (Valle et al, 2005). Por tanto decidimos analizar la posible cooperación entre TLS y PGC-1 α en la regulación de estos genes.

Para evaluar la posible cooperación entre TLS y PGC-1 α en la regulación de los genes del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial, se coexpresaron TLS y PGC-1 α en las células FAO utilizando los vectores adenovirales previamente descritos, Ad-T y Ad-PGC-1 α (Ad-P) o el correspondiente control. La multiplicidad de infección de cada uno de los adenovirus se redujo a la cuarta parte, de la utilizada en los ensayos mostrados previamente, para facilitar la detección de la posible cooperatividad. Se observó que la expresión simultánea de TLS y PGC-1 α (Ad P + T), resulta en una mayor inducción de la expresión de los genes analizados que por cada uno de los factores de forma independiente y ésta mayor inducción viene acompañada por el correspondiente aumento en los niveles de proteínas (Fig. 13 A y B). Para valorar si el efecto cooperativo es sensible al nivel de estrés oxidativo al que están sometidas las células, se realizó el mismo ensayo en paralelo, en células tratadas con niveles altos de glucosa (25 mM) durante 48 horas, que es un generador de estrés oxidativo mitocondrial. Los resultados obtenidos mostraron que en algunos casos, el efecto cooperativo estaba incrementado como para MnSOD, Cat, Prx5 y TrxR2, mientras que en otros no había diferencias significativas, es el caso de Trx2 y UCP-2 o incluso en el caso de PRX3 el efecto fue menor (Fig. 13C y D).

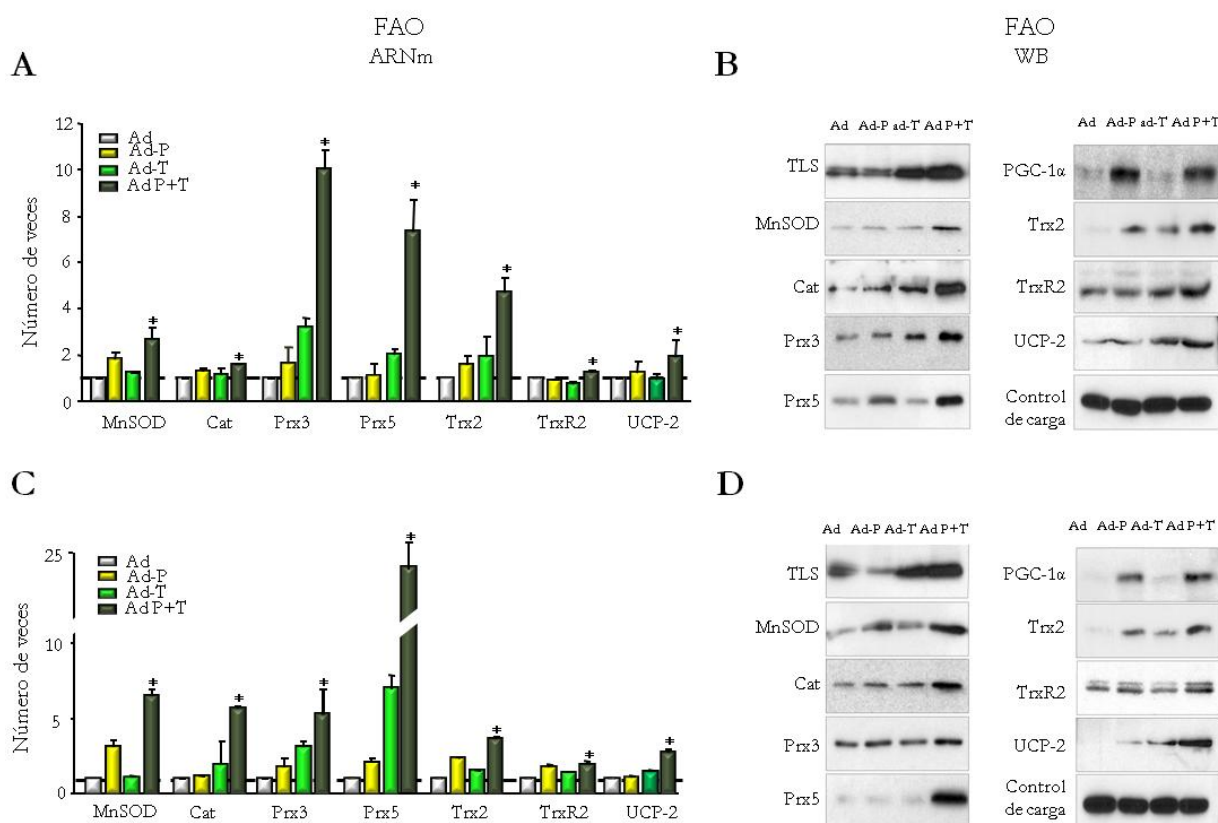


Figura 13. TLS y PGC-1 α inducen de forma cooperativa los genes de protección frente a ROS en células FAO. Las células FAO se infectaron con un Ad-TLS, Ad-PGC-1 α , con los dos adenovirus simultáneamente (Ad P+T) o con el correspondiente adenovirus control (Ad). **(A, B)** Las células se cultivaron durante 48 h en medio con glucosa 5 mM. **(C, D)** Las células se cultivaron durante 48 h en medio con glucosa 25 mM. **(A, C)** La expresión relativa de los genes indicados fue determinada por qRT-PCR a partir de ARN total. El ARN 18S fue utilizado como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó el valor de 1. **(B, D)** Análisis por Western Blot de las proteínas indicadas. **(A, C)** Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Para determinar si los cambios en la cooperatividad mediados por la inducción de estrés oxidativo eran debidos a diferencias en el grado de interacción entre TLS y PGC-1 α , se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación en los que se comprobó que la inducción de estrés oxidativo no afectaba significativamente a la formación del complejo PGC-1 α -TLS (Fig. 14).

Para estudiar el impacto de la cooperatividad sobre los niveles de ROS, se determinaron los ROS mediante marcaje de las células con la sonda CM-H₂DCFDA y posterior análisis por citometría de flujo. Se observó que, efectivamente, hay una menor acumulación de ROS en la células cuando se sobreexpresan TLS y PGC-1 α a la vez, que cuando se sobreexpresan cada uno de ellos por separado (Fig. 15 A). Para confirmar que esta disminución en los niveles de ROS estaba asociada a un aumento en la capacidad de detoxificación de la célula, se determinaron directamente las actividades catalasa y SOD confirmándose también en este caso el efecto cooperativo (Fig. 15 B y C).

Se puede concluir por tanto que la interacción entre TLS y PGC-1 α parece mediar la inducción cooperativa de genes antioxidantes y el consiguiente aumento de la capacidad de detoxificación de ROS en la célula.

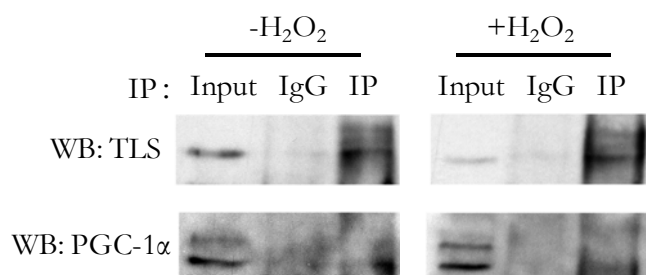


Figura 14. La formación del complejo TLS-PGC-1 α en hepatocitos murinos no se altera significativamente por la exposición a dosis moderadas de H₂O₂. Hepatocitos primarios de ratón en condiciones basales (panel izquierda) o tratados con 50 μ M de H₂O₂ durante 4 horas (panel de la derecha). PGC-1 α fue inmunoprecipitado con anticuerpos específicos y la cantidad de TLS presente en el inmunoprecipitado fue determinada mediante análisis por Western Blot.

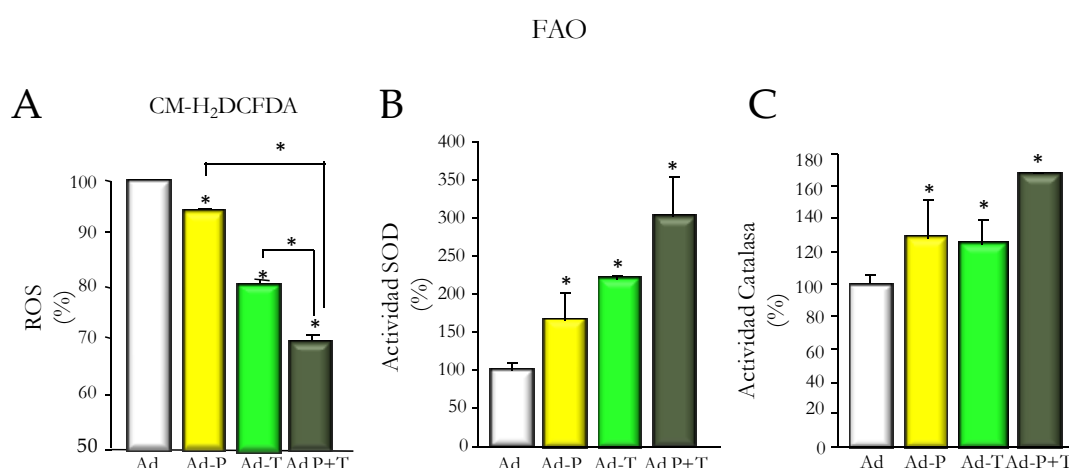


Figura 15. TLS coopera con PGC-1 α en el control de los ROS en células FAO. Las células se infectaron con Ad-TLS, Ad-PGC-1 α , con los dos adenovirus simultáneamente (Ad P+T) o con el correspondiente adenovirus control (Ad). **(A)** Determinación de ROS totales. Las células se marcaron con la sonda CM-H₂DCFDA y se analizaron los ROS por citometría de flujo. **(B-C)** Determinación de la actividad enzimática de la SOD **(B)** y de la catalasa **(C)** en extractos totales. A las muestras de referencia se les asignó el valor de 100%. **(A-C)** Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

La actividad reguladora de PGC-1 α sobre los genes de detoxificación de ROS depende de la presencia de TLS

Para evaluar hasta qué punto, la actividad reguladora de PGC-1 α sobre los genes de protección del sistema de detoxificación mitocondrial dependía de la presencia de TLS, se sobreexpresó PGC-1 α en células MEF TLS^{+/+} y TLS^{-/-} immortalizadas. Se observó que en las células MEF TLS^{+/+}, PGC-1 α es capaz de inducir aunque levemente, pero de forma estadísticamente significativa, la expresión de todos los genes sujetos de estudio implicados en la protección frente a estrés oxidativo de origen mitocondrial (Fig. 16 A), que va acompañado de un incremento en los niveles de las proteínas MnSOD, Cat, Prx3, Trx2 y UCP-2 pero no en los de Prx5 ni TrxR2 (Fig. 16 B). Sin embargo, en las células MEF TLS^{-/-} la capacidad de PGC-1 α para inducir estos genes resultó ser mucho menor o incluso en algunos casos estaba totalmente suprimida, tal y como se muestra en la figura 16 A. A nivel de ARNm en células MEF TLS^{-/-}, PGC-1 α sólo promueve la inducción de MnSOD siendo ésta significativamente menor que en células MEF TLS^{+/+}. De la misma forma que no hay una mayor dependencia de PGC-1 α en células MEF TLS^{-/-}. Para valorar el efecto de PGC-1 α sobre la acumulación de ROS en estas células, se marcaron las células con la sonda CM-H₂DCFDA y se analizó por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia. Los resultados obtenidos mostraron que la sobreexpresión de PGC-1 α sólo puede disminuir la acumulación de ROS en las células MEF TLS^{+/+} pero no en MEF TLS^{-/-} (Fig. 16 C). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la sobreexpresión de PGC-1 α , no puede compensar la deficiencia en TLS.

TLS no está implicado en la regulación de la biogénesis mitocondrial

El coactivador transcripcional PGC-1 α , regula entre otros, la expresión de los reguladores TFAM y NRF-1 para promover la biogénesis mitocondrial (Wu et al, 1999). PGC-1 α induce también directamente la expresión de genes nucleares que forman parte de la cadena de transporte de electrones como COX_{IV} y ATPase β (Huss et al, 2004; Uguccioni & Hood, 2011). Para valorar si TLS al igual que PGC-1 α , estaba implicado en la regulación de la biogénesis mitocondrial, se sobreexpresó TLS sólo o junto con PGC-1 α , en las células FAO y se determinaron los niveles de expresión de estos genes. Los resultados obtenidos mostraron que, la sobreexpresión de TLS sólo o coexpresado junto con PGC-1 α , no tiene como resultado un aumento en la expresión de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial (TFAM, NRF-1), ni en genes que codifican proteínas de la cadena de transporte electrónico. Por tanto, se puede concluir que, TLS no parece estar implicado en la biogénesis mitocondrial ni en el control del proceso de fosforilación oxidativa a diferencia de PGC-1 α (Fig. 17).

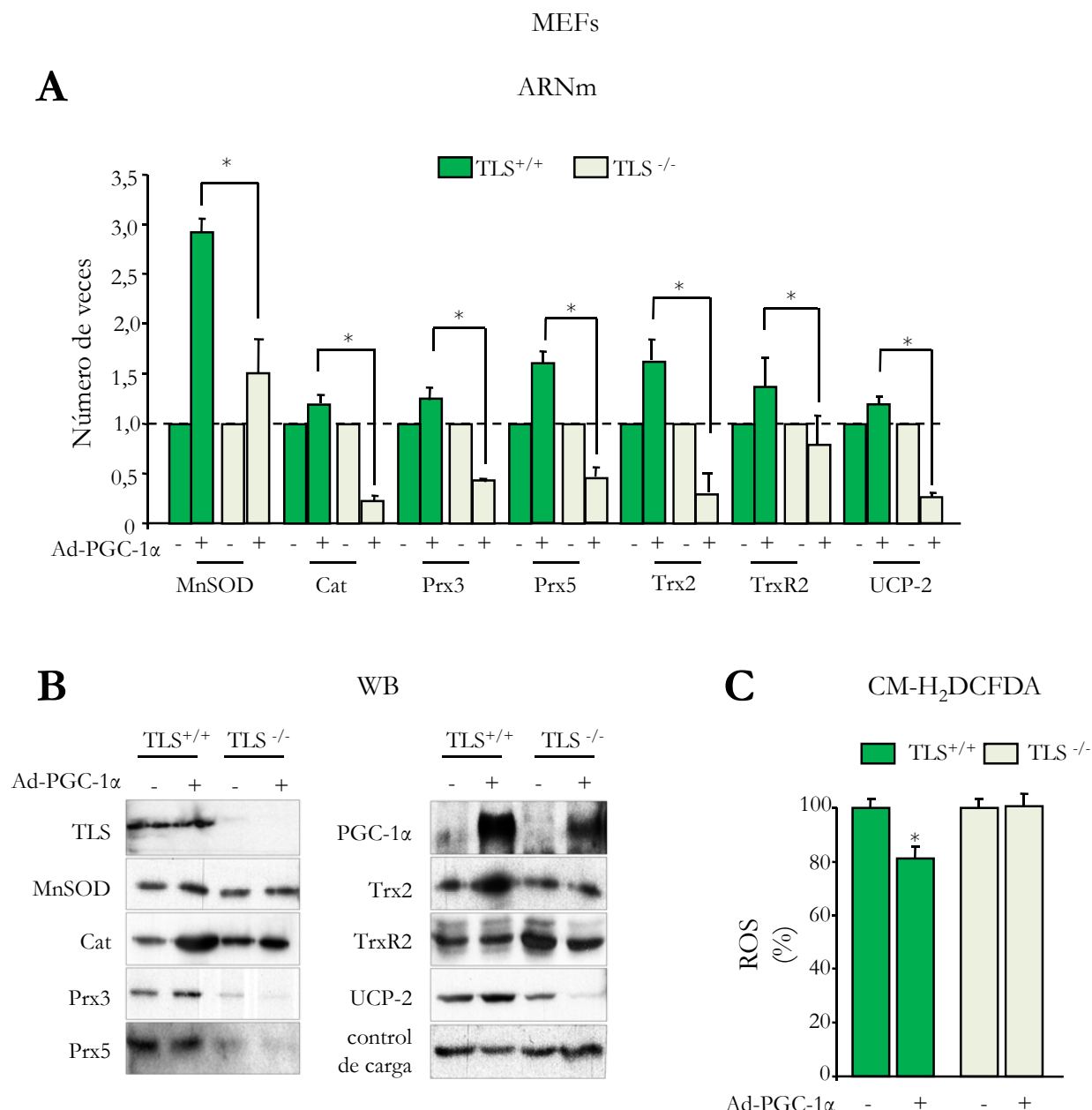


Figura 16. La actividad reguladora de PGC-1 α sobre genes antioxidantes depende de la presencia de TLS. Las células MEF TLS^{+/+} y TLS^{-/-} fueron infectadas con adenovirus de PGC-1 α (Ad-PGC-1 α) y un adenovirus control (Ad). **(A)** La expresión relativa de los genes indicados fue determinada por qRT-PCR a partir de ARN total. El ARN 18S fue utilizado como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó un valor de 1. **(B)** Análisis por Western Blot de las proteínas indicadas. **(C)** Determinación de ROS totales. Las células se marcaron con la sonda CM-H₂DCFDA y se analizaron por citometría de flujo. A las muestras de referencia se les asignó un valor de 100 %. **(A, C)** se muestran como la Media \pm desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

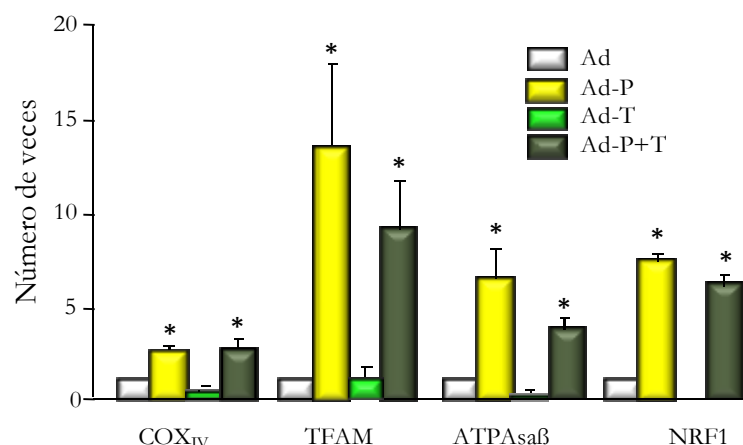


Figura 17. TLS no regula la biogénesis mitocondrial en células FAO. Las células FAO fueron infectadas con Ad-TLS, Ad-PGC-1 α , con los dos adenovirus simultáneamente (Ad P+T) o con el correspondiente adenovirus control (Ad). La expresión relativa de los genes indicados fue determinada por qRT-PCR a partir de ARN total. El ARN 18S fue utilizado como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó un valor de 1. La gráfica muestra la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

TLS no es capaz de inducir el sistema de detoxificación mitocondrial de ROS en ausencia de PGC-1 α

Con el objeto de evaluar si la inducción mediada por TLS sobre los genes de protección, frente a estrés oxidativo mitocondrial, es recíprocamente dependiente de PGC-1 α , se suprimió la expresión de TLS en hepatocitos primarios de ratón PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$ con el Ad-shTLS. Los resultados obtenidos mostraron que, mientras que en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ el silenciamiento de TLS, disminuye los niveles de expresión de los genes del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial, la capacidad de TLS de regular este sistema está disminuída en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$ en todos los casos, a excepción de MnSOD. Estas diferencias no se observaron a nivel de proteína lo que indica que TLS requiere de PGC-1 α para regular los genes del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial (Fig. 18 A y B). Para valorar su impacto en la acumulación de ROS, se marcaron los hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$ silenciados con Ad-shTLS con la sonda CM-H₂DCFDA y se analizó por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia. Observándose que en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ los ROS están incrementados respecto al control mientras que en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$ no se observa dicho incremento (Fig. 18C). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la actividad de TLS sobre los genes de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial es dependiente de PGC-1 α .

Con el fin de valorar la dependencia de PGC-1 α , en el reclutamiento de TLS a la regiones promotoras de *prx3* y *prx5* en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$ se hicieron ensayos de ChIP. El análisis de los resultados mostró que la asociación de TLS con las regiones promotoras de *prx3* y *prx5* era reducida drásticamente en los hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$, sugiriendo que la asociación de TLS a estas regiones promotoras está mediada por la interacción de TLS con PGC-1 α (Fig. 18D).

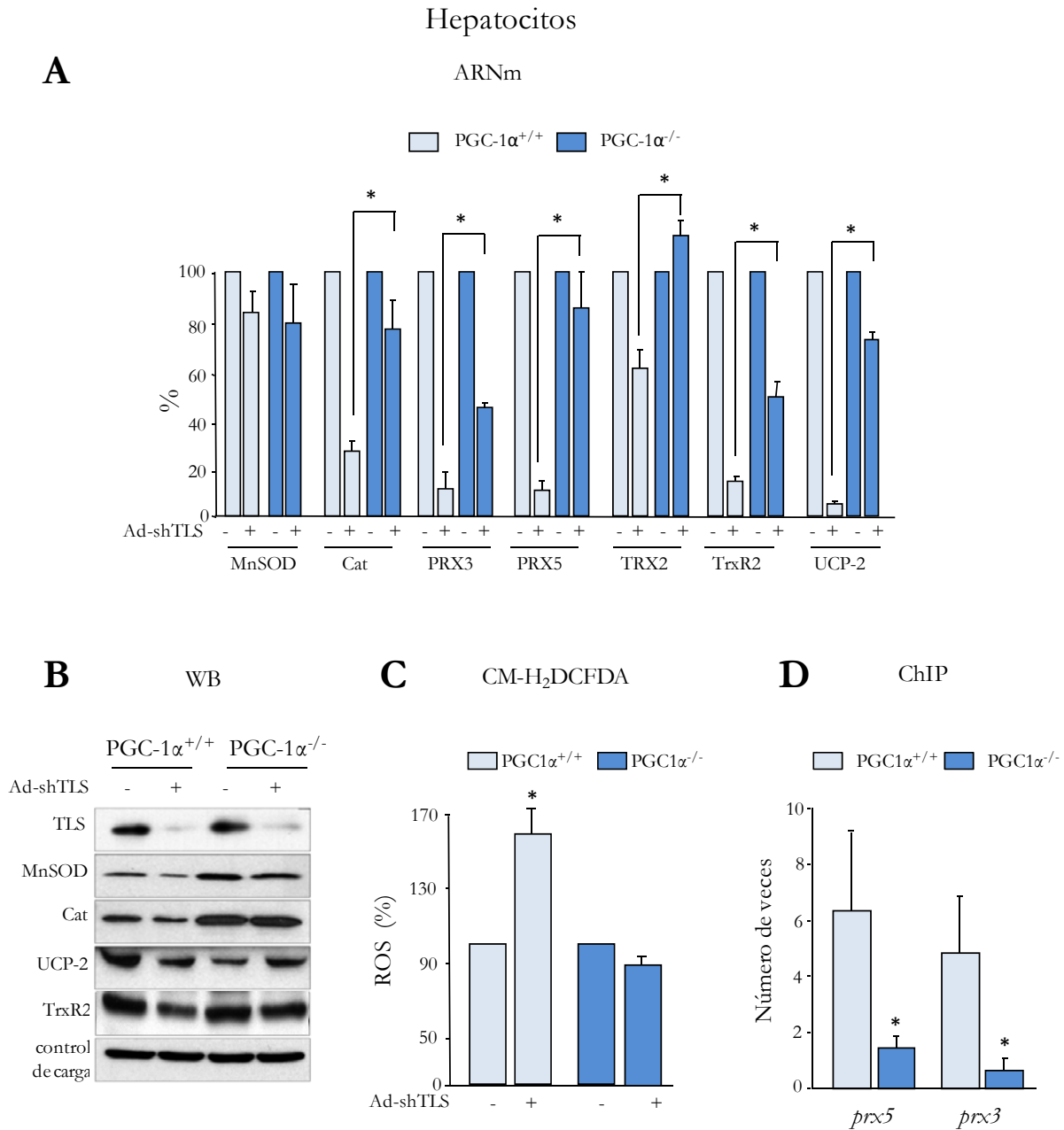


Figura 18 PGC-1 α y TLS son mutuamente dependientes en la regulación de los genes del sistema de detoxificación mitocondrial de ROS. Los hepatocitos primarios de ratón PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$ se infectaron con el adenovirus Ad-shTLS o con un adenovirus control (Ad-shControl). **(A)** La expresión relativa de los genes indicados fue determinada por qRT-PCR a partir de ARN total. El ARN de la β -actina fue utilizado como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó un valor de 100 %. **(B)** Análisis por Western Blot de las proteínas indicadas. **(C)** Determinación de ROS totales. Las células se marcaron con la sonda CM-H₂DCFDA y se analizó por citometría de flujo. A las muestras de referencia se les asignó un valor de 100 %. **(D)** La localización de TLS en las regiones promotoras de los genes indicados fue analizada en células FAO mediante un ensayo de ChIP. La secuencia codificante de la β -actina fue utilizada como control negativo. A las muestras de referencia (IgG) se les asignó el valor de 1. **(A, C-D)** Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

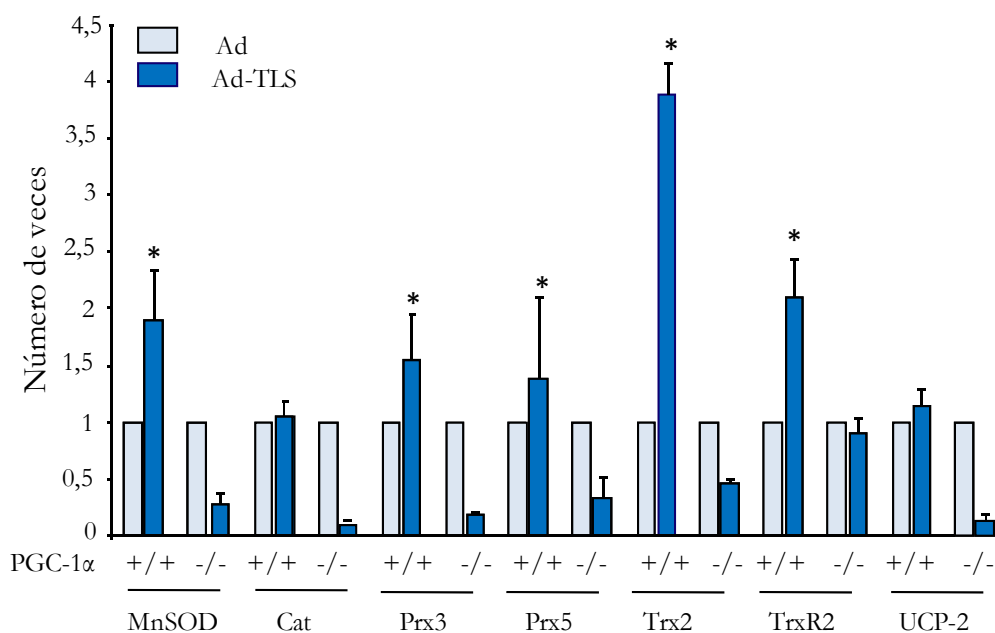
Además, la regulación de TLS sobre los genes de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial es también dependiente de PGC-1 α cuando se induce la expresión de TLS en hepatocitos, ya que, según se puede observar en la Figura 19 A, cuando se sobreexpresa TLS con el vector adenoviral Ad-TLS en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$, hay una inducción de la expresión de los genes del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial que no ocurre en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$.

Para confirmar que la regulación de TLS sobre los genes de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial dependía de PGC-1 α en otros sistemas celulares, se sobreexpresó TLS con el vector adenoviral Ad-TLS en MEF PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$ y se analizó la expresión de los genes del sistema detoxificación mitocondrial, inducida por TLS. Los resultados obtenidos mostraban que en células MEF PGC-1 $\alpha^{+/+}$ TLS inducía la expresión de los genes analizados, a excepción de prx3 y prx5 que no responden a TLS. Este aumento no se observan en células MEF PGC-1 $\alpha^{-/-}$ (Fig. 19 B).

Con estos resultados se puede concluir que TLS requiere la presencia de PGC-1 α , para regular los genes del sistema de detoxificación mitocondrial tanto en hepatocitos primarios de ratón como en células MEFs.

A

Hepatocitos (ARNm)



B

MEFs (ARNm)

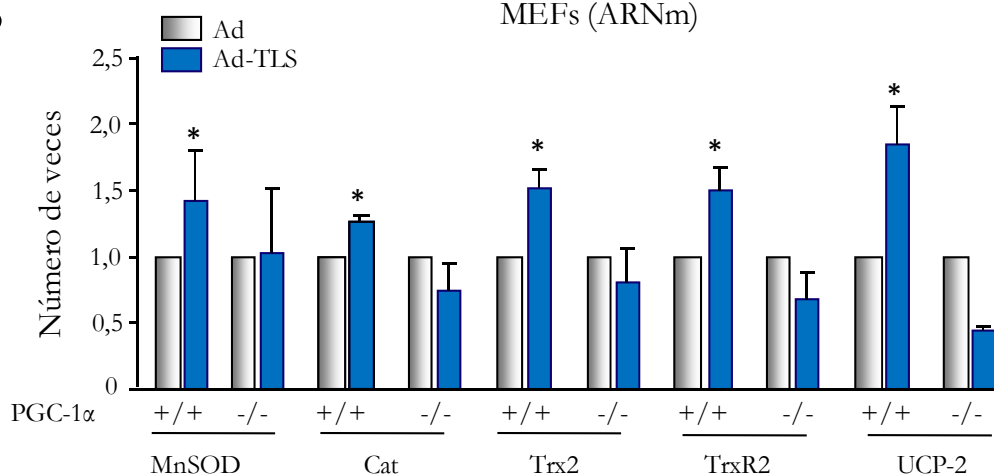


Figura 19. TLS no induce la expresión de genes de detoxificación de ROS en ausencia de PGC-1 α .

Hepatocitos primarios de ratón (A) o células MEF (B) PGC-1 α ^{+/+} y PGC-1 α ^{-/-} fueron infectados con adenovirus Ad-TLS o con un adenovirus control (Ad). La expresión relativa de los genes indicados fue determinada por qRT-PCR a partir de ARN total. El ARN 18S fue utilizado como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó un valor de 1. Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

La actividad transcripcional de TLS es altamente dependiente de la presencia de PGC-1 α

Los resultados obtenidos hasta el momento, parecían sugerir que las actividades de TLS y PGC-1 α eran complementarias y estaban sólo parcialmente solapadas. Con el fin de determinar el grado de dependencia de TLS, sobre la presencia de PGC-1 α a nivel genómico, se llevó a cabo un análisis con “microarrays” de expresión de genoma completo con ARN total de hepatocitos primarios procedentes de ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$ que habían sido infectados con Ad-shTLS o con Ad-shControl. El análisis de los genes regulados diferencialmente por TLS permitía identificar a 2578 genes cuya expresión aparecía diferencialmente alterada por shTLS en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$, de los cuales, sólo 955 estaban también diferencialmente expresados en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$ y 202 genes eran diferencialmente expresados única y exclusivamente en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$.

Al analizar por separado los genes cuya expresión era diferencialmente aumentada o disminuida por shTLS, se observó que de los 1060 genes que tenían disminuida su expresión en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$, sólo 253 tenían también reducida su expresión en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$, mientras que, 74 genes tenían su expresión disminuida por shTLS sólo en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$. Por otra parte, de los 1518 genes que mostraron una expresión diferencialmente aumentada por shTLS en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$, 702 genes tenían también su expresión aumentada en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$, 128 genes tenían su expresión aumentada por shTLS únicamente en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$ (Fig. 20A) Este conjunto de datos, sugiere que la actividad transcripcional de TLS es parcialmente dependiente de PGC-1 α y afecta en mayor medida a los genes regulados positivamente por TLS, en los que más del 75% de los genes que responden a TLS, no lo hacen en ausencia de PGC-1 α . Es importante también reseñar que TLS, para regular un pequeño grupo de genes, requiere de hecho, la ausencia de PGC-1 α .

El análisis del grado de respuesta de los distintos grupos de genes a shTLS, en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$ muestra como media una reducción en un 50% del grado de inducción o supresión por shTLS de aquellos genes que aparecen regulados diferencialmente por TLS en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ respecto al grado de inducción o supresión en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$, lo que sugiere una disminución homogénea y generalizada en la actividad de TLS en ausencia de PGC-1 α , en todos aquellos genes cuya expresión es codependiente de PGC-1 α (Fig. 20B).

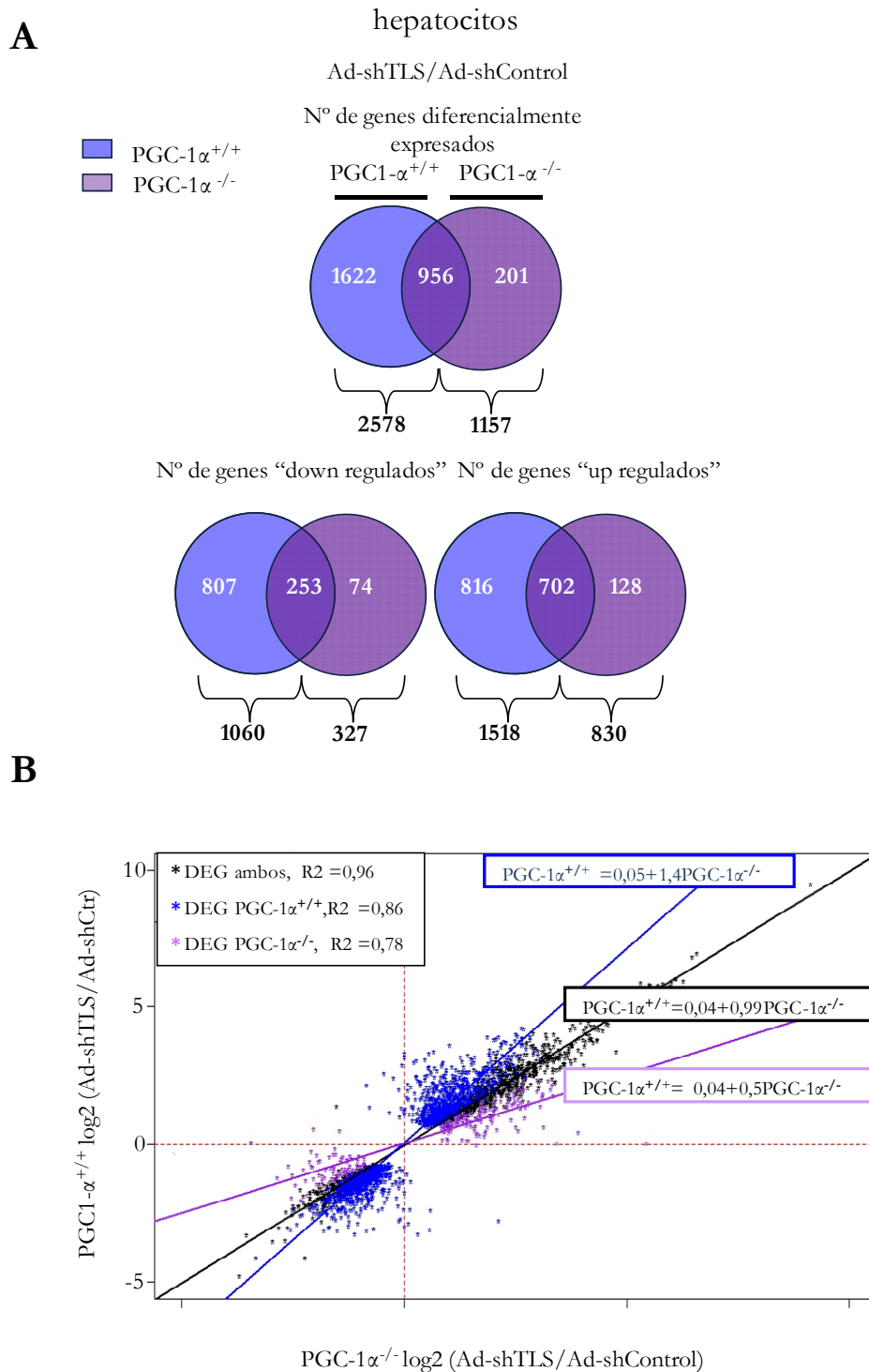


Figura 20. Análisis del genoma completo de la actividad transcripcional de TLS y su dependencia de la presencia de PGC-1 α . Los arrays de expresión del genoma completo se usaron para evaluar los cambios de expresión en hepatocitos primarios de ratón PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$ infectados con el adenovirus de interferencia de TLS (Ad-shTLS) y con el correspondiente adenovirus control (Ad-shC). **(A)** Los diagramas de Venn muestran el número de genes totales diferencialmente expresados por Ad-shTLS en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$, PGC-1 $\alpha^{-/-}$ o en ambos. **(B)** El gráfico de dispersión de genes diferencialmente expresados por Ad-shTLS muestra que los genes de color azul son genes cuya regulación en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$, está reducida en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$. Los genes de color negro son genes cuyo regulación en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ está igualmente regulada en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$. Los genes de color morado son genes cuyo regulación es mayor en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$.

Con el fin de valorar que funciones biológicas estaban reguladas por TLS, se llevó a cabo un análisis funcional de los datos utilizando el programa *Ingenuity*. El resultado del análisis mostró que TLS parece ser importante en el control de genes que regulan el metabolismo celular al igual que en hepatocitos PGC-1 α , además de estar implicado en otras actividades ya descritas para TLS, como son el control del ciclo celular y el cáncer (Fig. 21). Esta observación es coherente con la información derivada de estudios previos sobre la actividad de TLS, ya que se ha descrito a TLS como un proto-oncogen (Croizat et al, 1993; Rabbitts et al, 1993) y un promotor de la parada de ciclo en respuesta al daño genotóxico (Kuroda et al, 2000).

En la figura 22A y 22B se muestra una lista con los 20 genes más fuertemente regulados al alza o a la baja por shTLS en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$, en la que se incluyen los datos obtenidos para estos genes en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$.

Distribución funcional de los genes regulados positivamente por TLS

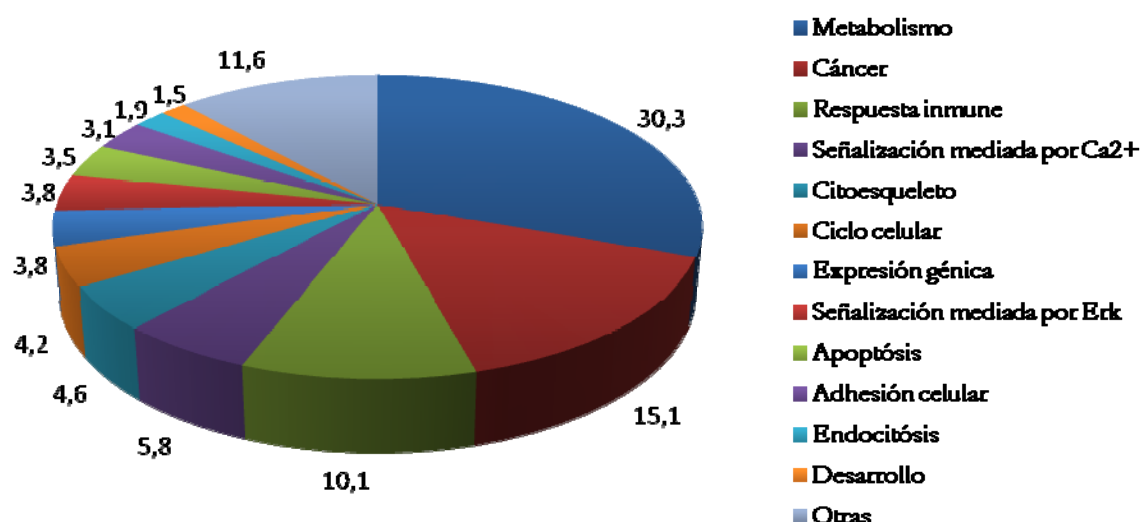


Figura 21. Distribución funcional de los genes regulados por shTLS en hepatocitos primarios de ratón. El programa Ingenuity fue utilizado para analizar la distribución funcional de los genes regulados por Ad-shTLS en hepatocitos primarios de ratón. El gráfico muestra en porcentaje las principales funciones indentificadas

A

Lista de los 20 genes más fuertemente “up” regulados por TLS

gen	Proteína	PGC1- $\alpha^{+/+}$ log2(shTLS/shCtr)	adj <i>p</i> value	PGC1- $\alpha^{-/-}$ log2(shTLS/shCtr)	adj <i>p</i> value
<i>Cldn2</i>	claudin-2	-4,7625	0,004847	-3,6807	0,022208
<i>Hsd3b5</i>	3-beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase	-4,1193	0,018085	-3,3091	0,060249
<i>Anks1b</i>	AIDA-1	-4,0950	0,000960	-2,2200	0,032002
<i>Ubie</i>	Ubiquinone	-3,5113	0,001586	-2,9366	0,005086
<i>C230035116Rik</i>	desconocida	-3,4785	0,011074	-2,6545	0,046782
<i>Mplb</i>	melanophilin1	-3,2921	0,006520	-3,5228	0,005622
<i>Xpnpep2</i>	X-prolyl aminopeptidase	-3,2513	0,020283	0,3243	0,812333
<i>Gzmd</i>	granzyme D	-3,2398	0,038417	-1,0964	0,462563
<i>9930111J21Rik</i>	desconocida	-3,1368	0,040939	-0,8222	0,579582
<i>9530096D07Rik</i>	desconocida	-3,1364	0,031196	-1,4899	0,276342
<i>NAP034039-1</i>	desconocida	-3,1317	0,016547	-1,7915	0,141157
<i>TC1600999</i>	desconocida	-3,0842	0,015944	-2,5310	0,050064
<i>LOC620079</i>	hypothetical protein	-3,0761	0,023329	0,5971	0,634627
<i>Lin54</i>	lin-54 homolog (C. elegans)	-3,0692	0,021767	0,7468	0,133538
<i>BC106179</i>	desconocida	-3,0238	0,014602	-2,6104	0,038926
<i>Mrgprb3</i>	MAS-related GPR, member B3	-3,0181	0,018809	-2,8091	0,037460
<i>Plscr3</i>	Phospholipid scramblase 3	-3,0156	0,003453	-1,1615	0,101653
<i>Entpd8</i>	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8	-2,9935	0,004123	-1,6588	0,068656
<i>Il3</i>	interleukin-3	-2,9876	0,042027	0,0169	0,992510
<i>Anp32a</i>	acidic nuclear phosphoprotein 32 family, member A	-2,9588	0,029677	-1,2300	0,332180

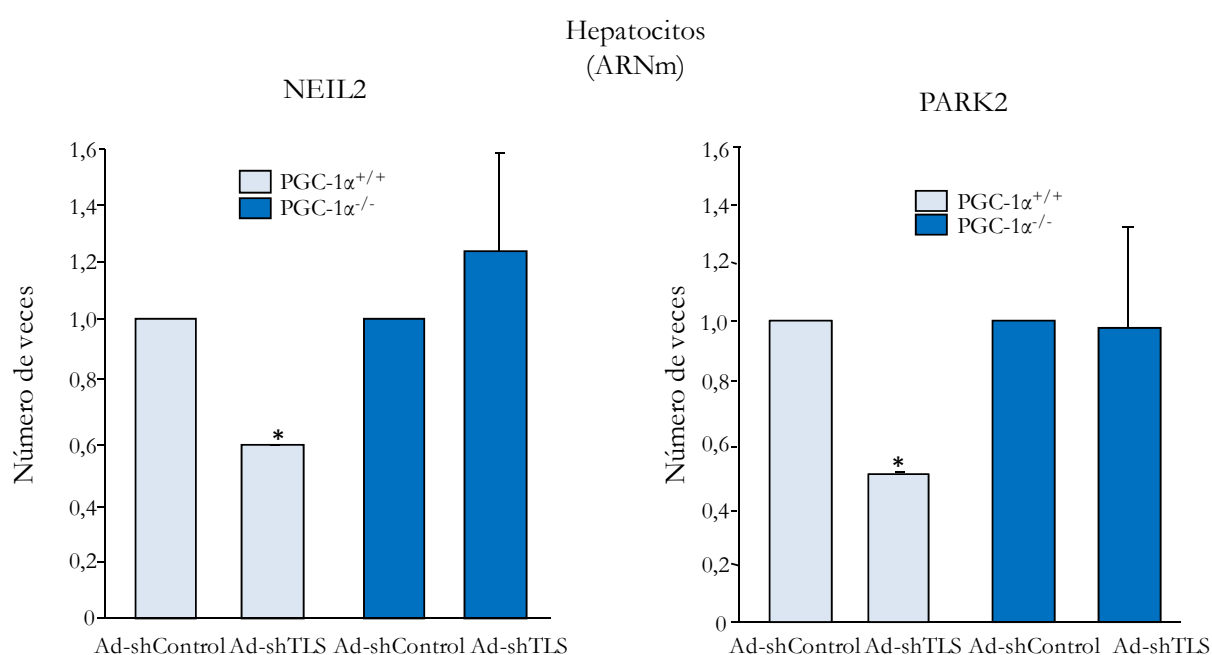
B

Lista de los 20 genes más fuertemente “down” regulados por TLS

gen	Proteína	PGC1- $\alpha^{+/+}$ log2(shTLS/shCtr)	adj <i>p</i> value	PGC1- $\alpha^{-/-}$ log2(shTLS/shCtr)	adj <i>p</i> value
<i>Sox12</i>	Transcription factor SOX-12	9,5002	0,000326	9,1412	0,411 10 ⁻³
<i>Cxxc6</i>	TET1	6,9569	0,000097	6,5895	0,134 10 ⁻³
<i>Cck</i>	Cholecystokinin	6,8334	0,000123	0,4568	0,781714
<i>A_52_P877097</i>	desconocida	6,0632	0,000037	6,1319	0,030 10 ⁻³
<i>Olfir738</i>	olfactory receptor 738	6,0477	0,000016	6,1156	0,013 10 ⁻³
<i>Fndc8</i>	fibronectin type III domain containing 8	5,9647	0,000207	6,2843	0,127 10 ⁻³
<i>TC1719751</i>	desconocida	5,8899	0,000063	5,3262	0,119 10 ⁻³
<i>Xcr1</i>	Chemokine XC receptor 1	5,8869	0,000010	6,0151	0,006 10 ⁻³
<i>Gtphp3</i>	GTP binding protein 3	5,8698	0,000037	-0,4511	0,548513
<i>Unc5d</i>	unc-5 homolog D	5,8242	0,000505	5,5297	0,710 10 ⁻³
<i>Tbc1d2</i>	TBC1 domain family, member 21	5,7955	0,000026	5,7119	0,027 10 ⁻³
<i>Arl10</i>	ADP-ribosylation factor-like 101	5,7743	0,000026	-1,0458	0,105760
<i>Asb7</i>	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 7	5,7627	0,000016	-1,0685	0,140550
<i>AK036326</i>	desconocida	5,5209	0,000044	5,7643	0,030 10 ⁻³
<i>CA481501</i>	desconocida	5,5100	0,000318	4,6868	0,975 10 ⁻³
<i>E230015B07Rik</i>	desconocida	5,5002	0,000010	5,4391	0,009 10 ⁻³
<i>Adprbl1</i>	ADP-ribosylhydrolase like 1	5,4203	0,000016	5,6044	0,013 10 ⁻³
<i>Terc</i>	telomerase RNA component	5,3626	0,000016	-0,6817	0,611241
<i>B230396O12Rik</i>	desconocida	5,3510	0,000016	5,0655	0,020 10 ⁻³
<i>A_51_P516033</i>	desconocida	5,2432	0,000065	5,3998	0,043 10 ⁻³

Figura 22. Lista de los genes más fuertemente regulados por TLS en hepatocitos primarios de ratón. Listado de los 20 genes mas fuertemente “up” regulados (A) o “down” regulados (B) por Ad-shTLS en hepatocitos primarios de ratón PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y en PGC-1 $\alpha^{-/-}$. Las tabla muestran el número de veces de cambio en los niveles de expresión inducidos por shTLS tanto en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ como en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$, así como el valor *p* ajustado. Los genes que se comportan de forma significativamente distinta en respuesta al shTLS en PGC-1 $\alpha^{+/+}$ versus PGC-1 $\alpha^{-/-}$ se indican en azul.

Con el fin de validar los resultados del array del genoma completo, se analizaron por qPCR los niveles de ARNm de dos de los genes identificados como regulados por TLS en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ pero no en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$ y posiblemente implicados en la respuesta al daño genotóxico. ParK2, es una ubiquitin ligasa frecuentemente alterada en tumores malignos humanos (Morris et al, 2010). Neil2, es una ADN glicosilasa que participa en la reparación del ADN (Hegde et al, 2008). Los resultados obtenidos mediante qPCR confirmaron que la expresión de ambos genes era suprimida por shTLS en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ pero no en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$. Lo que parece confirmar aunque de manera muy preliminar que



PGC-1 α puede ser relevante en la respuesta al daño genotóxico. (Fig. 23).

Figura 23. Validación por qRT-PCR de los resultados obtenidos en los arrays. La expresión los genes *neil2* y *park2* se determinó en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$ infectados con Ad-shTLS o con un adenovirus control (Ad-shcontrol). La expresión relativa de los genes indicados fue determinada por qRT-PCR a partir de ARN total. El valor obtenido para la β -actina fue utilizado como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó un valor de 1. Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Por último, se quiso comprobar si el hecho de que TLS tuviera una actividad transcripcional reducida sobre los genes del sistema de detoxificación mitocondrial en ausencia de PGC-1 α , era debido a una alteración en la distribución celular de TLS. Se valoró la localización subcelular por inmunofluorescencia de TLS en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$. Se ha descrito que TLS se encuentra normalmente distribuido entre el núcleo y el citoplasma (Fujii & Takumi, 2005). Los resultados obtenidos muestran que la localización subcelular de TLS no parece significativamente afectada por la ausencia de PGC-1 α . Por tanto, la reducción

en la actividad de TLS en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{-/-}$ no puede ser atribuida a cambios en la localización subcelular de TLS. (Fig. 24)

Hepatocitos (Inmunofluorescencia)

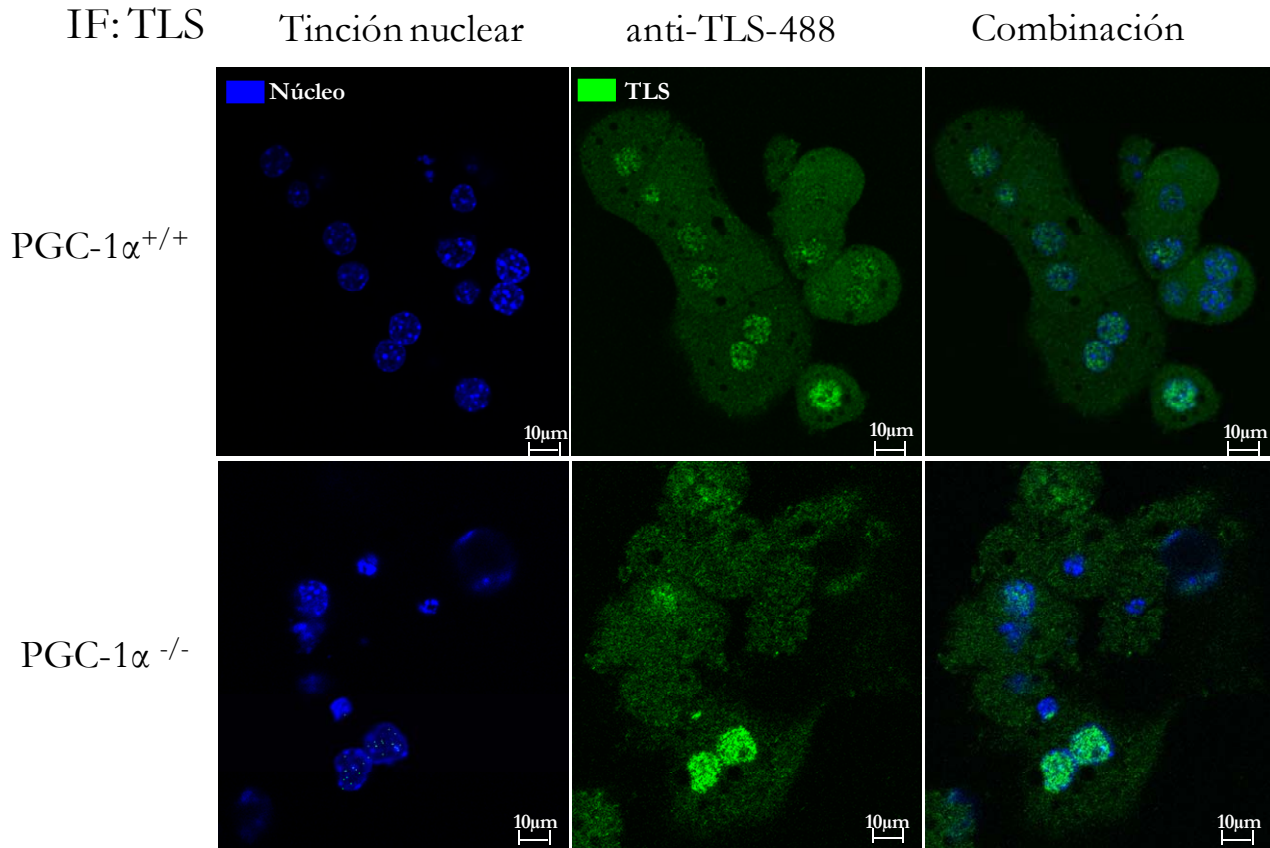


Figura 24. La localización subcelular de TLS en hepatocitos primarios de ratón no esta alterada significativamente por la ausencia de PGC-1 α . La localización subcelular de TLS en hepatocitos primarios de ratón PGC-1 α ^{+/+} y PGC-1 α ^{-/-}, se determinó por inmunofluorescencia y se analizó mediante microscopía confocal. TLS se muestra en color verde y el marcaje de los núcleos realizado con Hoesch se muestra en color azul.

Capítulo II: PGC-1 α
tiene un papel protector frente
a la lesión por isquemia
reperfusión

PGC-1 α y el sistema de detoxificación de ROS se encuentra disminuido en ratones con esteatosis hepática

La sobrealimentación tiende a reducir la actividad del metabolismo oxidativo celular, aumentando el uso de la glicolisis, como fuente fundamental para generar ATP. Este cambio metabólico lleva asociado una reducción en los niveles de expresión y en la actividad de toda una serie de genes implicados directa o indirectamente en el metabolismo mitocondrial, incluido PGC-1 α (Dobrian et al, 2001; Boirie, 2003; Sparks et al, 2005; Roberts et al, 2006).

Cuando se llega a una situación patológica denominada obesidad o síndrome metabólico, se observa además una situación generalizada de estrés oxidativo. Varios autores apoyan la idea de que es la disfunción mitocondrial es la responsable de esta situación de estrés, aunque hasta la fecha no hay una demostración definitiva (Whaley-Connell et al, 2011; Yang et al, 2011). Nuestra hipótesis de trabajo es que esta situación de estrés está directamente unida a la pérdida de actividad de PGC-1 α .

Con el fin de analizar como la esteatosis hepática afectaba a los niveles de PGC-1 α , dos grupos de ratones fueron alimentados uno con dieta normal y otro con dieta grasa, durante siete semanas y se analizó en el tejido hepático, el nivel de expresión de PGC-1 α tanto a nivel de ARNm como de proteína. Los resultados obtenidos mostraron una reducción en los niveles de expresión de PGC-1 α en el hígado de ratones con esteatosis hepática respecto al hígado de los ratones alimentados con una dieta normal (Fig. 25A). Este mismo resultado ha sido publicado recientemente en un estudio en el que observan además una bajada dependiente de PGC-1 α en la biogénesis mitocondrial en ratones con hígado graso (Aharoni-Simon et al, 2011).

Dado que, como hemos visto anteriormente, PGC-1 α regula diversos sistemas antioxidantes en el hepatocito, decidimos determinar si la bajada en los niveles de PGC-1 α en el hígado graso iba acompañada por una disminución en la expresión de estos genes y de otras dianas bien caracterizadas de PGC-1 α como Cyt C, que forma parte de la CTE y VEGF, un factor proangiogénico. Como control se llevaron en paralelo muestras obtenidas a partir de hígados de ratones PGC-1 α ^{-/-}. Los resultados obtenidos muestran que con excepción de UCP-2, todos los genes objeto de estudio tenían su expresión disminuida tanto en ratones PGC-1 α ^{-/-} como en ratones PGC-1 α ^{+/+} con hígado graso (Fig. 25B y C). Este resultado confirmaba, por una parte, que la actividad de PGC-1 α sobre los sistemas antioxidantes, previamente observada en ensayos *in vitro* sobre hepatocitos, es activa y relevante en el contexto hepático. Por otra, mostraba por primera vez, una reducción generalizada en los sistemas que protegen a la célula de los ROS mitocondriales en el hígado graso, lo que apoya la hipótesis de un origen mitocondrial del estrés oxidativo asociado a la esteatosis. Finalmente, estos resultados sugerían que la baja actividad de PGC-1 α en el hígado graso es la responsable de esta disminución en la expresión de los sistemas antioxidantes. Mención aparte merece UCP-2, que es inducible por ROS de forma independiente de PGC-1 α y cuya inducción está bien caracterizada en distintas patologías

que cursan con toxicidad mitocondrial mediada por lípidos, incluido la EHNA (Uchino et al, 2004; Fulop et al, 2006; Jiang et al, 2008).

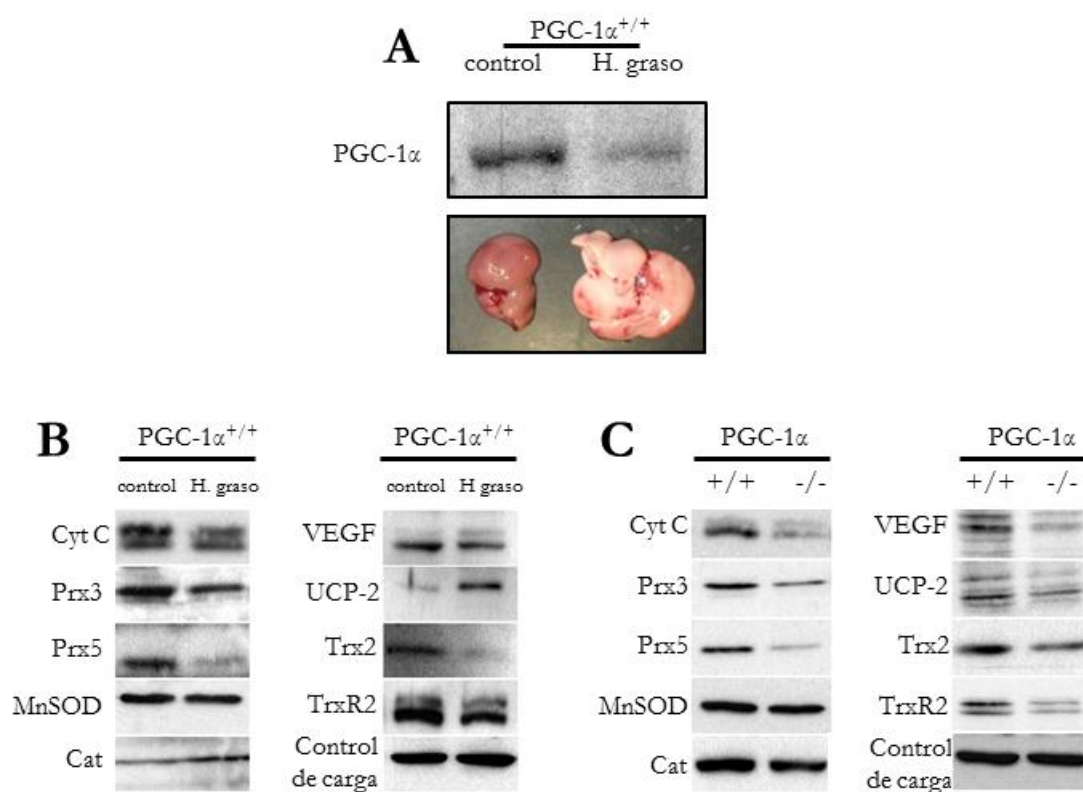


Figura 25. La expresión de PGC-1 α y varios sistemas antioxidantes se encuentra disminuida en ratones con hígado graso. (A) Panel superior. La expresión de PGC-1 α en ratones con hígado normal y en ratones con hígado graso fue analizada por western blot con anticuerpos específicos. **Panel inferior.** Imagen de un hígado control y de un hígado hígado esteatótico. **(B, C)** Determinación por Western Blot de las proteínas indicadas procedentes de extractos totales de hígados de ratones con hígado normal (control) o con hígado graso **(B)** y de hígados de ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ o PGC-1 $\alpha^{+/+}$ **(D)**. La β -actina fue utilizada como control de carga.

La expresión de PGC-1 α se induce en respuesta al preconditionamiento isquémico (PCI)

Diversos trabajos apoyan la hipótesis de que los ROS mitocondriales juegan un papel importante en el daño tisular por IR (Zwacka et al, 1998; Yabe et al, 2001; Zhou et al, 2001; Kevin et al, 2003; Solaini & Harris, 2005; Chen et al, 2006a; Zweier & Talukder, 2006). Además, varios estudios proponen también que el aumento en la producción mitocondrial de ROS tras la reperusión es la señal fundamental que induce los cambios adaptativos asociados al PCI (Lebuffe et al, 2003; Kim et al, 2010).

Teniendo en cuenta que se ha descrito que PGC-1 α se regula positivamente tanto por hipoxia como por ROS (Valle et al, 2005; St-Pierre et al, 2006; Arany et al, 2008; Olmos et al, 2009) y que PGC-1 α regula positivamente los sistemas antioxidantes en el hígado, decidimos estudiar si PGC-1 α se inducía en el hígado

en respuesta a un protocolo de IR con o sin PCI como primer paso, para valorar su posible contribución protectora frente al daño por IR. Los resultados obtenidos muestran que PGC-1 α se induce a las 6 horas tras la IR y su inducción es mucho mayor cuando se realiza un protocolo de IR con PCI previo (Fig. 26A y B). Este resultado es coherente con las observaciones previas de estudios *in vitro*, sobre la regulación por PGC-1 α y permite proponer que la inducción de PGC-1 α pueda estar implicada en el PCI.

Para valorar esta hipótesis, comenzamos por analizar si la inducción de PGC-1 α ocurría o no en el hígado graso. Los resultados obtenidos mostraron que el grado de inducción de la expresión de PGC-1 α tanto por la IR como en el PCI previo era mucho menor que en el caso del hígado normal. Además, el pequeño aumento observado a nivel de ARNm no se traduce en un incremento en los niveles de proteína, a diferencia de lo que ocurre en los hígados normales (Fig. 26C y D). Este resultado es coherente con la hipótesis de que la pérdida de la actividad de PGC-1 α podría ser responsable de la falta de respuesta del hígado graso al PCI, así como del nivel exacerbado de daño que sufre el hígado graso tras el trasplante.

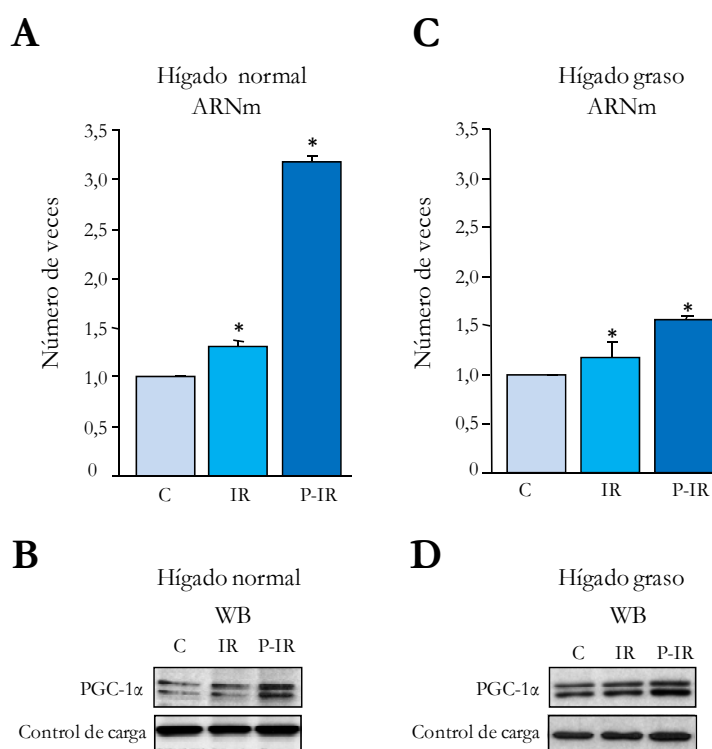


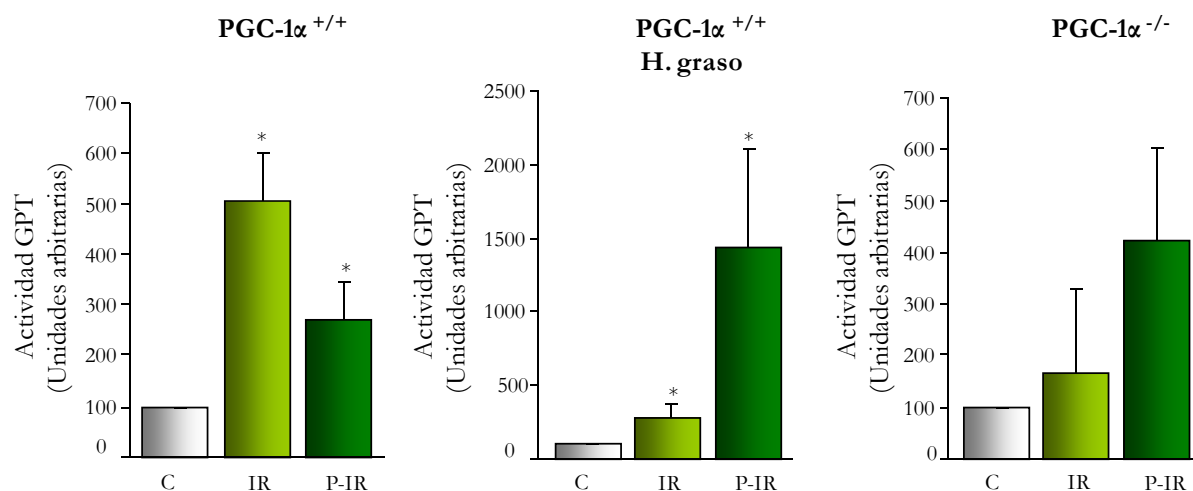
Figura 26. PGC-1 α se induce en respuesta al preconditionamiento isquémico (PCI). Ratones con hígado normal e hígado graso fueron sometidos a un protocolo de isquemia reperusión hepática sin (IR) o con preconditionamiento previo (P-IR). La expresión de PGC-1 α fue determinada a nivel de ARNm mediante qRT-PCR (A, C) y a nivel de proteína, mediante Western Blot (B, D) en muestras procedentes de ratones con hígado normal (A, B) o con hígado graso (C, D). A las muestras de referencia se les asignó un valor de 1. Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

La ausencia de PGC-1 α agrava la lesión asociada al daño por IR

Los resultados anteriores muestran que PGC-1 α se induce durante el proceso de PCI en ratones control pero no en ratones con esteatosis hepática. Con el fin de evaluar directamente el efecto de la ausencia de PGC-1 α sobre la lesión hepática, decidimos estudiar la respuesta de los ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ al proceso de IR sin o con PCI previo, comparando dicha respuesta con la de los ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$ normales o con hígado graso. Como primera aproximación para evaluar el nivel de daño hepático, se analizó la actividad de las transaminasas GPT y GOT en plasma a las 24 horas. Los resultados obtenidos para los ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$ mostraron por una parte, que el protocolo de PCI era adecuado, dado que éste disminuía el nivel de transaminasas, respecto a los ratones que sufrieron el proceso de IR sin PCI. Se comprobó además, que, como ya se había descrito previamente, los ratones con hígado graso muestran una actividad transaminasa basal más elevada que los ratones normales. Además, esta actividad transaminasa aumenta mucho más que en los ratones normales tras el protocolo de IR y que efectivamente el PCI no reduce el nivel de daño, sino que al contrario, lo aumenta (Fig. 27A). En los ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ la medida de la actividad transaminasas mostró un comportamiento similar al de los ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$ con hígado graso, dado que, la actividad de las enzimas transaminasas es mayor en los ratones en los que se les aplica el protocolo de IR con PCI que en aquellos ratones sometidos al protocolo de IR sin PCI (Fig. 27B y C).

Este resultado sugiere que, la presencia de PGC-1 α es necesaria para que el hígado responda adecuadamente al PCI y apoya la hipótesis de que la deficiencia observada en PGC-1 α en los hígados grasos puede ser la causante de la falta de respuesta al PCI.

A



B

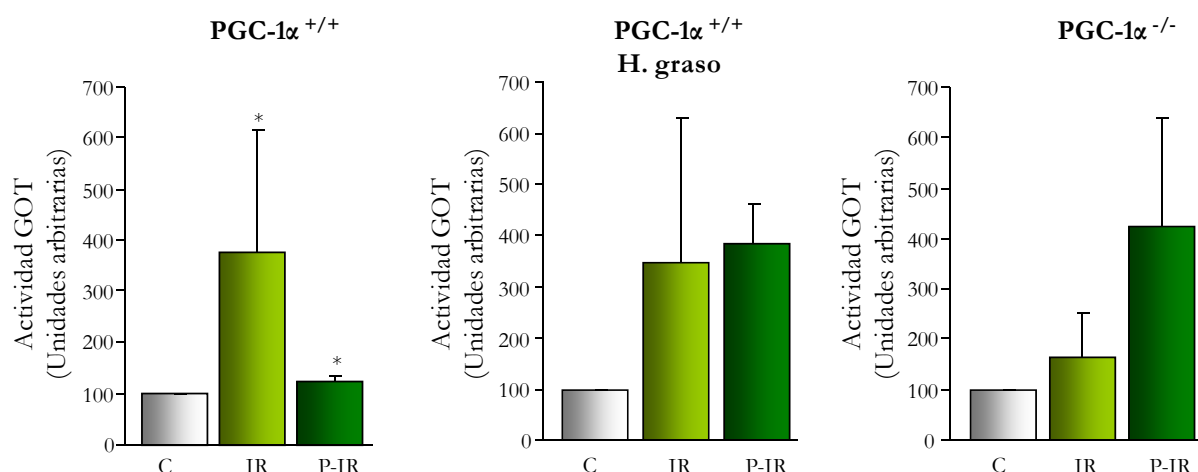


Figura 27. Los hígados de ratones PGC-1 α ^{-/-} no responden al preconditionamiento isquémico. Ratones con hígado normal (PGC-1 α ^{+/+}), ratones con hígado graso (PGC-1 α ^{+/+} H. graso) y ratones PGC-1 α ^{-/-} fueron sometidos a un protocolo de isquemia reperusión hepática sin (IR) o con preconditionamiento previo (P-IR). Las gráficas muestran el análisis de la actividad de las transaminasas GPT (A) y GOT (B) en el plasma de esto ratones a las 24 h tras la cirugía: (A-B) Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Para valorar directamente, como la ausencia de PGC-1 α afectaba a al tejido hepático tras la IR, se obtuvieron cortes de tejido hepático de estos mismos grupos de ratones y se realizó un estudio histológico de las muestras a través de la tinción con hematoxilina-eosina. Las muestras se tomaron tanto a las 24 horas tras la cirugía, que evalúa la fase aguda del daño isquémico, como una semana después, lo que permite evaluar la resolución del proceso inflamatorio y de la actividad regenerativa del tejido.

El análisis de las imágenes adquiridas para las muestras obtenidas a las 24 horas confirmó el buen funcionamiento del protocolo con PCI, dado que en los ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$ se observan pequeñas lesiones en las muestras de los ratones sometidos al protocolo de IR sin PCI, mientras que en las muestras de los ratones sometidos al protocolo con PCI previo, prácticamente, no se detectan lesiones (Fig. 28).

Por otra parte, las muestras obtenidas de los ratones con hígado graso, muestran como a nivel basal, estos hígados tienen hepatocitos con estructura altamente “vacuolizada” debido a la acumulación de grasa en el interior del hepatocito. El protocolo de preparación de las muestras hace que esta grasa se pierda, pero queda como “huella” estas formas similares a las vacuolas, al microscopio óptico. En las muestras de ratones con hígado graso sometidas a IR, se aprecian lesiones de mayor tamaño, que en las observadas en los hígados de ratones con dieta normal, frecuentemente acompañadas de lo que parecen infiltrados inflamatorios, así como hemorragias, completamente ausentes en los ratones con dieta normal sometidos al mismo protocolo. Los hígados grasos sometidos al protocolo con PCI previo, muestran lesiones aún más extensas, lo que confirma la ausencia de respuesta al PCI en estos ratones (Fig. 28).

En las muestras procedentes de ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$, la estructura del hígado control es aparentemente normal tal y como se ha descrito previamente en Lin et al, 2004. Sin embargo, tras el protocolo de IR se observan lesiones de mayor tamaño que las observadas en los hígados de ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$, frecuentemente acompañadas de infiltrado inflamatorio, al igual que lo observado en ratones con hígado graso. En las muestras de ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ sometidas al protocolo con PCI previo, se observa de nuevo y al igual que en los ratones con hígado graso, un aumento en el tamaño de las lesiones y una pérdida en zonas amplias, de la estructura normal hepática (Fig. 28).

Estos resultados apoyan la idea de que PGC-1 α es necesario tanto para que el hígado tenga una buena respuesta a la IR, como para que se produzcan los cambios adaptativos que median en la protección del hígado tras el protocolo del PCI.

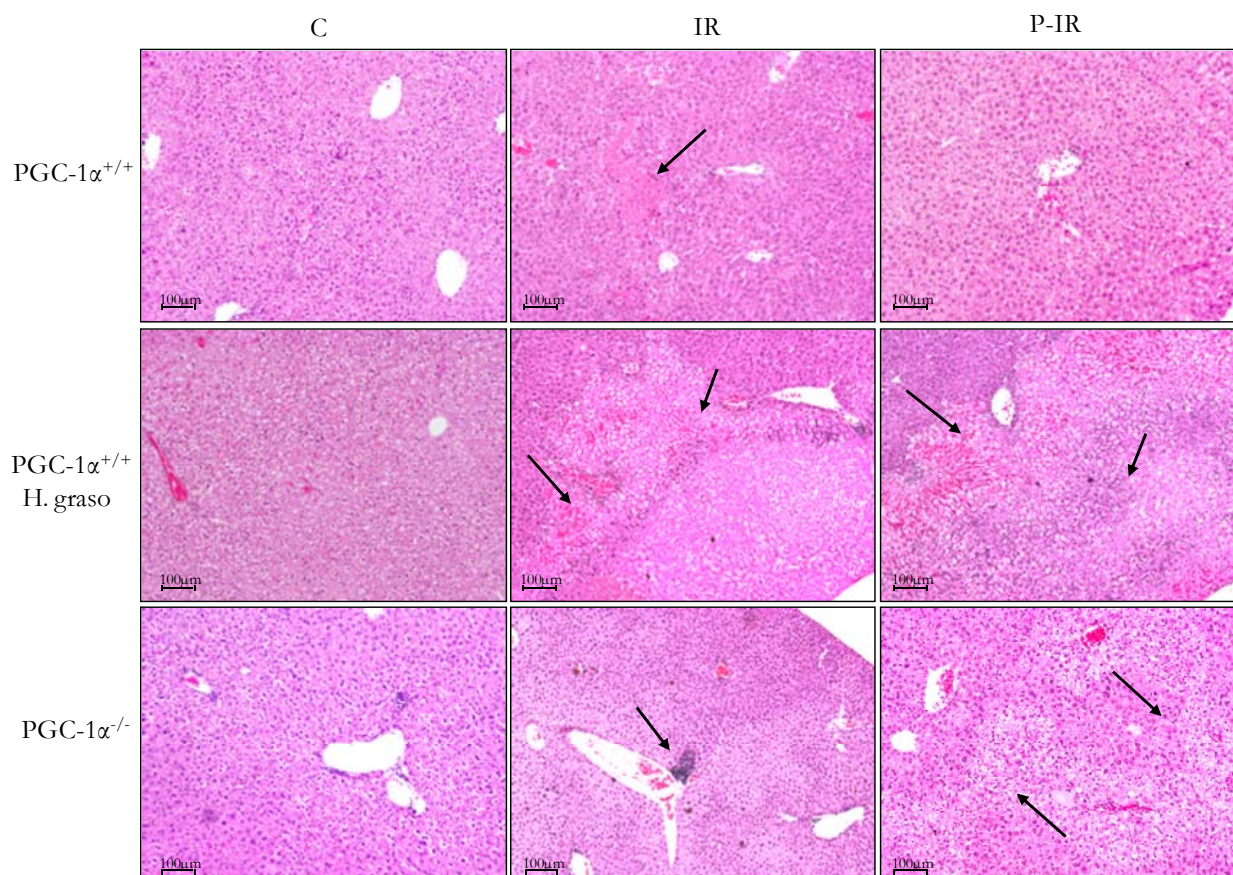


Figura 28. El daño hepático agudo por IR en ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ es similar al observado en ratones con hígado graso. Ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$ (paneles superiores) ratones con hígado graso (paneles centrales) y ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ (paneles inferiores), fueron sometidos al proceso de ischemia-reperfusión sin (IR) y con preconditionamiento isquémico previo (P-IR). La figura muestra tinciones hematoxilina-eosina de cortes de muestras de hígado tomadas a las 24h post-cirugía. Las flechas indican áreas particularmente afectadas.. La barra de escala representa 100 μ m.

En las muestras tomadas a la semana, en los ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$ sometidos al protocolo de IR, se pueden encontrar lo que parecen pequeñas áreas fibróticas, no detectables en los ratones sometidos al protocolo con PCI (Fig. 29). En los ratones con hígado graso, en las muestras sometidas al protocolo de IR sin PCI se observaron infiltrados inflamatorios que ocupaban áreas muy extensas, acompañados frecuentemente de lo que parecen zonas de fibrosis. En estos ratones, el PCI no permitió la supervivencia de un 70 % de los casos más allá del día 5. Cuando el ratón sobrevivió a la operación se observó que el ratón presentaba un grado de esteatosis menos severa de lo normal, a pesar de lo cual se observó una desestructuración generalizada del hígado, con focos de infiltrados inflamatorios (Fig. 29). Los ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ si que fueron capaces de sobrevivir una semana tras la operación, pero en ellos y al igual que en los ratones con hígado graso se observan zonas que parecen asimilarse a zonas fibróticas en los ratones sometidos a IR y una pérdida total de estructura normal hepática en los ratones sometidos al protocolo con PCI previo (Fig. 29). Este resultado indica que la dependencia de la presencia de PGC-1 α es relevante no sólo en las fases iniciales del daño isquémico sino también en la respuesta “regenerativa” del hígado.

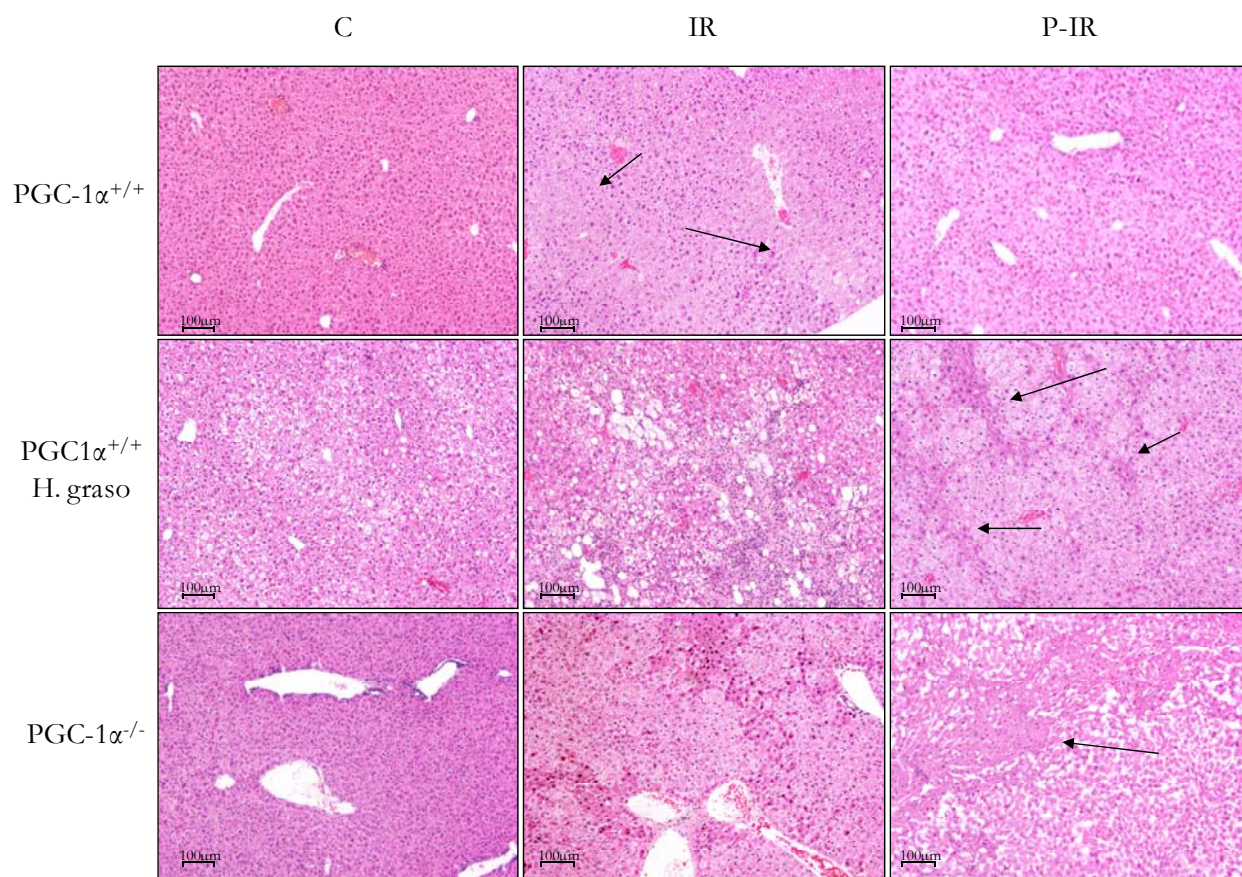


Figura 29. El daño hepático crónico por IR en ratones PGC-1α^{-/-} es similar al observado en ratones con hígado graso. Ratones PGC-1α^{+/+} (paneles superiores) ratones con hígado graso (paneles centrales) y ratones PGC-1α^{-/-} (paneles inferiores), fueron sometidos a un protocolo de isquemia reperusión hepática sin (IR) o con preconditionamiento previo (P-IR). La figura muestra tinciones hematoxilina-eosina de cortes de muestras de hígado tomadas 7 días post-cirugía. Las flechas indican áreas particularmente afectadas. La barra de escala representa 100μm.

Para evaluar directamente el grado de muerte por apopt sis que sufrían los hepatocitos, se realizaron tinciones de túnel de las muestras de hígado recogidas a las 24 h post cirugía. La tinción de túnel detecta mediante microscopía de fluorescencia, la presencia de roturas de doble cadena en el ADN que se producen cuando una célula ha entrado en apoptosis (Gavrieli et al, 1992). El análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia reveló que en las muestras procedentes de ratones PGC-1 ^{+/+}, a nivel basal, no se detectan núcleos apoptóticos, tras el protocolo de IR aparecen algunos núcleos apoptóticos, que vuelven a ser casi indetectables, en las muestras de ratones sometidos al protocolo con PCI previo. En las muestras procedentes de ratones con hígado graso se observa como yase ha descrito previamente, una tinción positiva ya en los hígados control, que aumenta de manera importante en las muestras de los hígados sometidos a la IR y aún más en las muestras de hígados sometidos al protocolo con PCI previo.

En las muestras procedentes de ratones PGC-1 ^{-/-} no se observa núcleos positivos en las muestras control, sin embargo, en las muestras con el protocolo IR el número de núcleos es significativamente mayor que en las muestras correspondientes de ratones PGC-1 ^{+/+} y este número aumenta aún más, en el caso de ratones sometidos al protocolo con PCI previo, al igual que ocurre en las muestras de ratones con hígado graso (Fig. 30).

Tomados en su conjunto estos resultados confirman que PGC-1  es esencial en la protección frente al daño isquémico y media en el PCI.

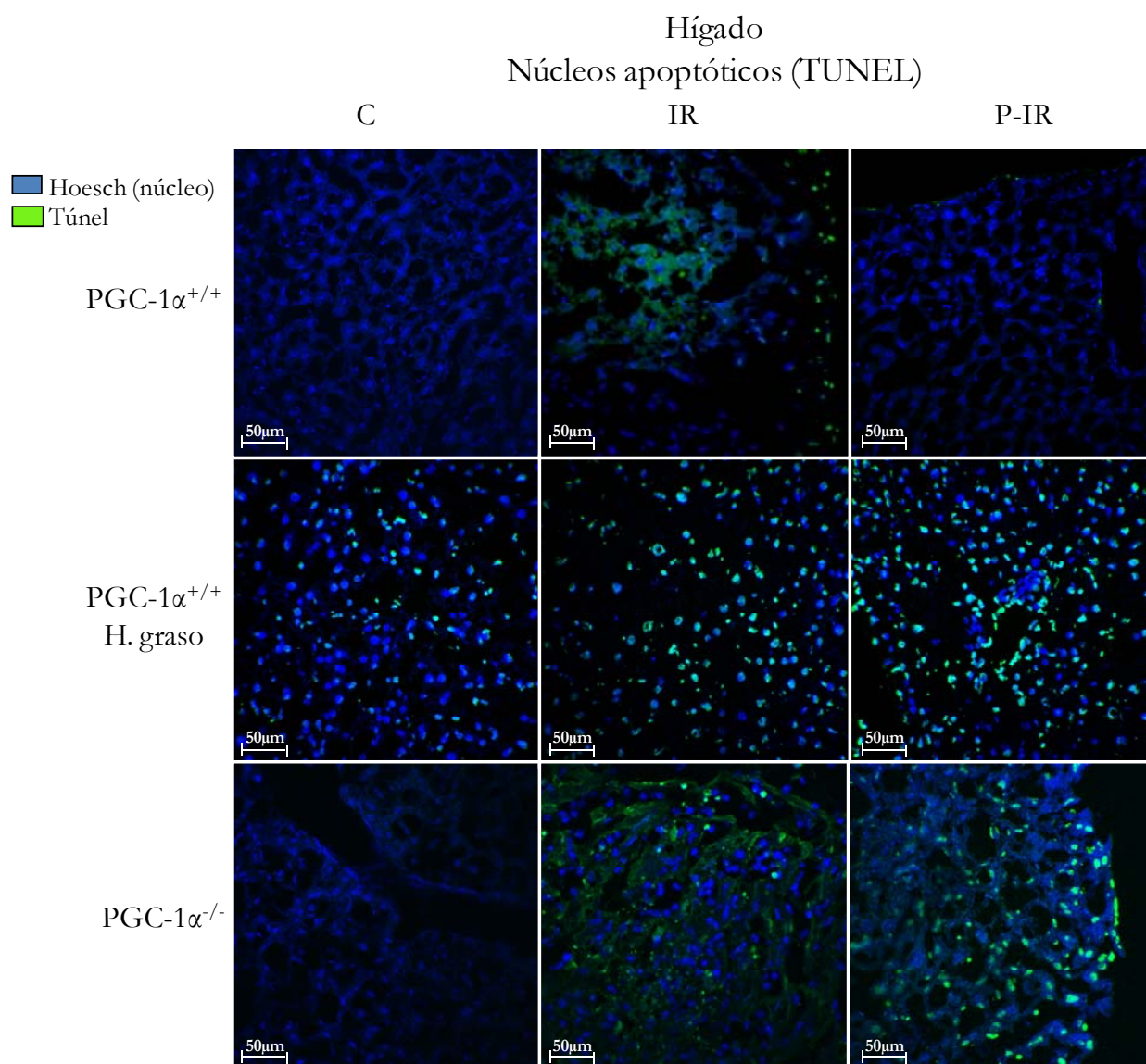


Figura 30. La reducción mediada por el PCI en el número de núcleos apoptóticos en el hígado, depende de la presencia de PGC-1 α y no se observa en hígados grasos. Ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$ (paneles superiores) ratones con hígado graso (paneles centrales) y ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ (paneles inferiores) fueron sometidos a un protocolo de ischemia reperusión hepática sin (IR) o con preconditionamiento previo (P-IR). (A) Cortes de tejido hepático fueron sometidos a tinción de TUNEL para núcleos apoptóticos y visualizados mediante microscopía confocal. Las muestras se tomaron a las 24 horas post cirugía. Las células positivas a la tinción de TUNEL se muestran en color verde. Los núcleos aparecen de color azul. La barra de escala representa 50 μ m.

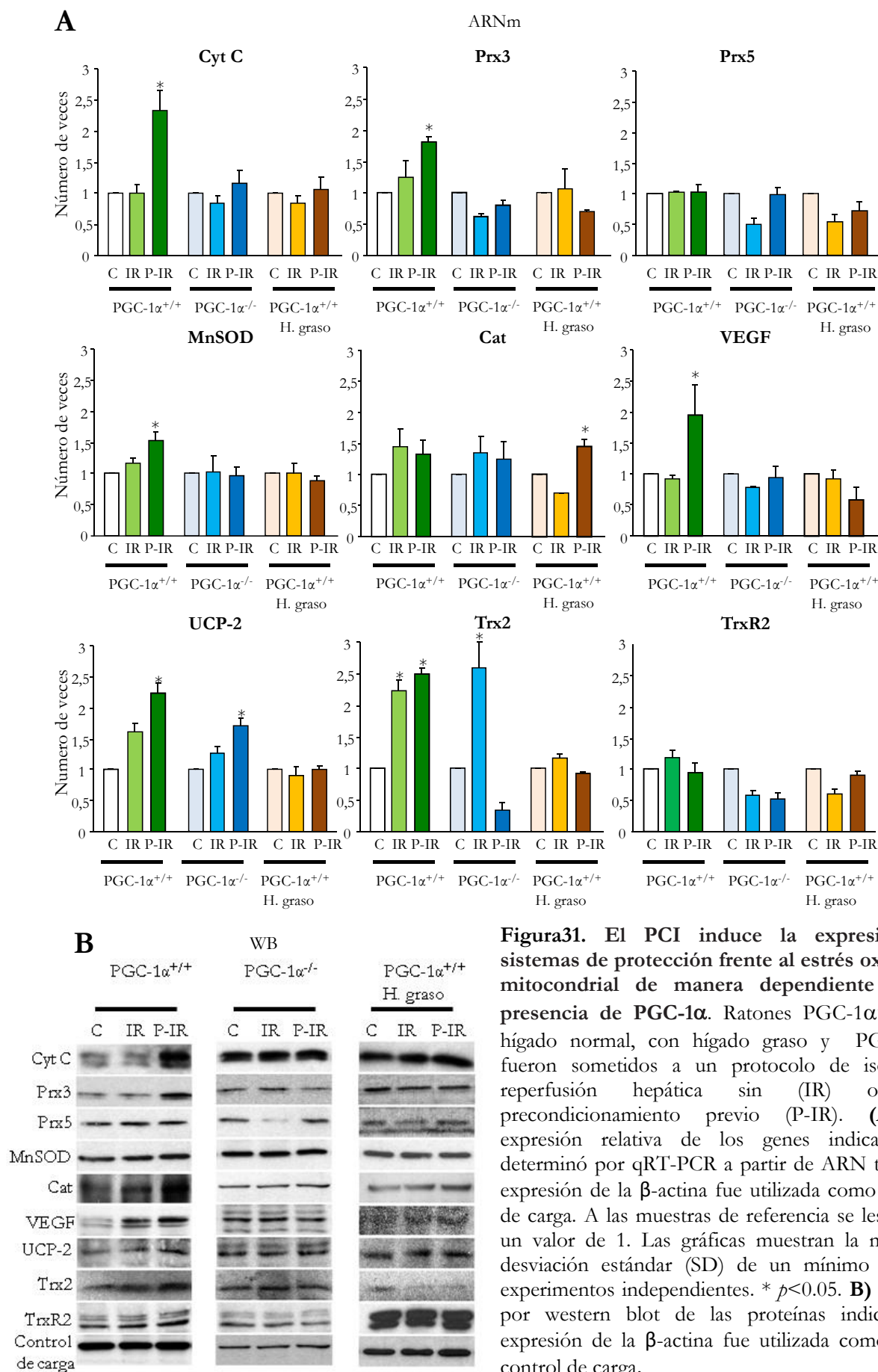
PGC-1 α media la inducción del sistema de protección frente a los ROS mitocondriales en el PCI

Los resultados mostrados hasta este momento indican que PGC-1 α participa en la protección frente al daño por IR y es necesario para el PCI. Dado que se ha propuesto que los sistemas antioxidantes pueden participar en la protección frente a la lesión por IR y que PGC-1 α regula la expresión de varios de estos genes, nos propusimos valorar si los sistemas antioxidantes regulados por PGC-1 α se inducían al igual que el propio PGC-1 α en la respuesta al PCI y si esta regulación era dependiente de la presencia de PGC-1 α .

Para ello, empezamos por evaluar el comportamiento de los genes antioxidantes regulados por PGC-1 α en respuesta al protocolo de IR sin o con PCI previo en ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$. Observamos que efectivamente, hay una inducción general tanto a nivel de ARNm como de proteína (determinados a las 6 y 24 h post cirugía respectivamente) de estos sistemas y esta inducción es mayor en ratones sometidos al protocolo con PCI, lo que sugiere que la inducción de estos sistemas puede tener un papel protector frente al daño por IR (Fig. 31).

Cuando se evaluó la respuesta de estos sistemas, en ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ se observó en casi todos los casos, una ausencia de respuesta tanto a nivel de ARNm como de proteína, tanto en las muestras IR como en las muestras de hígados sometidos al protocolo con PCI previo. Una posible excepción es UCP-2 para el que se observa una pequeña inducción a nivel de ARNm que no se traduce en un incremento de la proteína. Este resultado indica que la inducción de los sistemas antioxidantes observada en la IR y amplificada por el PCI, es dependiente de la presencia de PGC-1 α . El análisis de las muestras procedentes de ratones con hígado graso confirmó una pérdida en la inducción por IR y falta de respuesta al PCI de los sistemas antioxidantes (Fig. 31).

Este resultado nos permite proponer por una parte, que la baja actividad de PGC-1 α debe ser la responsable de la falta de la inducción de los sistemas antioxidantes en respuesta a la IR y al PCI y que además, esto puede ser el factor determinante del aumento en la sensibilidad al daño de los hígados grasos, debido a que están sometidos a un alto nivel de estrés oxidativo que no pueden paliar mediante la inducción de los sistemas de protección.



PGC-1 α participa en la regulación de los mecanismos moleculares que ocurren durante la isquemia reoxigenación en hepatocitos

Los resultados mostrados hasta ahora indican que PGC-1 α se induce en respuesta a la IR y ésta inducción es importante en la protección frente al daño isquémico, pero no indica cuál es el mecanismo que media en la inducción de PGC-1 α . Para intentar dilucidar el mecanismo por el cual la expresión de PGC-1 α se aumenta en respuesta a la IR en el hígado, decidimos intentar poner a punto un protocolo *in vitro* de hipoxia-reoxigenación, con hepatocitos primarios aislados de ratón que se asemeja a la regulación observada en el modelo *in vivo*.

Teniendo en cuenta que la tensión de O₂ normal en los tejidos está en torno a un 3%, los hepatocitos se mantuvieron en un incubador de hipoxia al 3% de O₂ hasta su uso experimental. Para evaluar el efecto de la hipoxia, los hepatocitos se transfirieron a una cámara de hipoxia equilibrada al 1% de O₂ y se mantuvieron allí durante 14 h, tiempos más largos dan lugar a la inducción de procesos apoptóticos. Para estudiar el efecto de la reperfusión, los hepatocitos que habían estado al 1% de O₂ durante 14 h se transfirieron a una segunda cámara equilibrada al 3% de O₂ durante 6 h, antes de ser recogidos para su análisis. Los ensayos se realizaron tanto en presencia como en ausencia de suero para evaluar el efecto de la presencia de factores de crecimiento.

Los ensayos realizados en presencia de suero mostraron que tras 14 h de hipoxia (1 % O₂) se producía una reducción en los niveles de ARNm de PGC-1 α , mientras que tras seis horas de vuelta a la normoxia (3% O₂) se observaba una inducción en los niveles de ARNm de PGC-1 α . Seguidamente, se comprobó por western blot que a nivel de proteína, la hipoxia (1% O₂, 14 h) también reducía la expresión de PGC-1 α mientras que la normoxia la aumentaba (3% O₂ 6 h) (Fig 32).

Para valorar el impacto de estos cambios en los genes regulados por PGC-1 α se analizaron los cambios de expresión en el mismo conjunto de genes que se estudió en los experimentos *in vivo* y que incluye fundamentalmente sistemas antioxidantes. Los resultados mostraron que en presencia de suero sólo los cambios observados en los niveles de ARNm de Prx3, Prx5 y UCP-2 tenían el mismo patrón que los observados para PGC-1 α . Cuando se analizaron por western blot los niveles de estas proteínas, se observó que solamente UCP-2 reducía su expresión en hipoxia (Fig 32).

Para evaluar si estos cambios en los genes regulados por PGC-1 α eran realmente debidos a las variaciones en los niveles de PGC-1 α , se realizó el mismo tipo de ensayo en hepatocitos PGC-1 α ^{-/-}, observándose que los cambios en los niveles de expresión de Prx3, Prx5 y UCP-2 previamente observados en hepatocitos PGC-1 α ^{+/+} tanto a nivel de ARNm como de proteína se seguían observando en hepatocitos PGC-1 α ^{-/-}, por lo que no podían atribuirse a este factor (Fig 32).

Estos resultados sugerían por tanto que la hipoxia sostenida no induce la expresión de PGC-1 α sino que la reduce, al menos en presencia de suero y además sugerían que en presencia de suero PGC-1 α es muy poco activo.

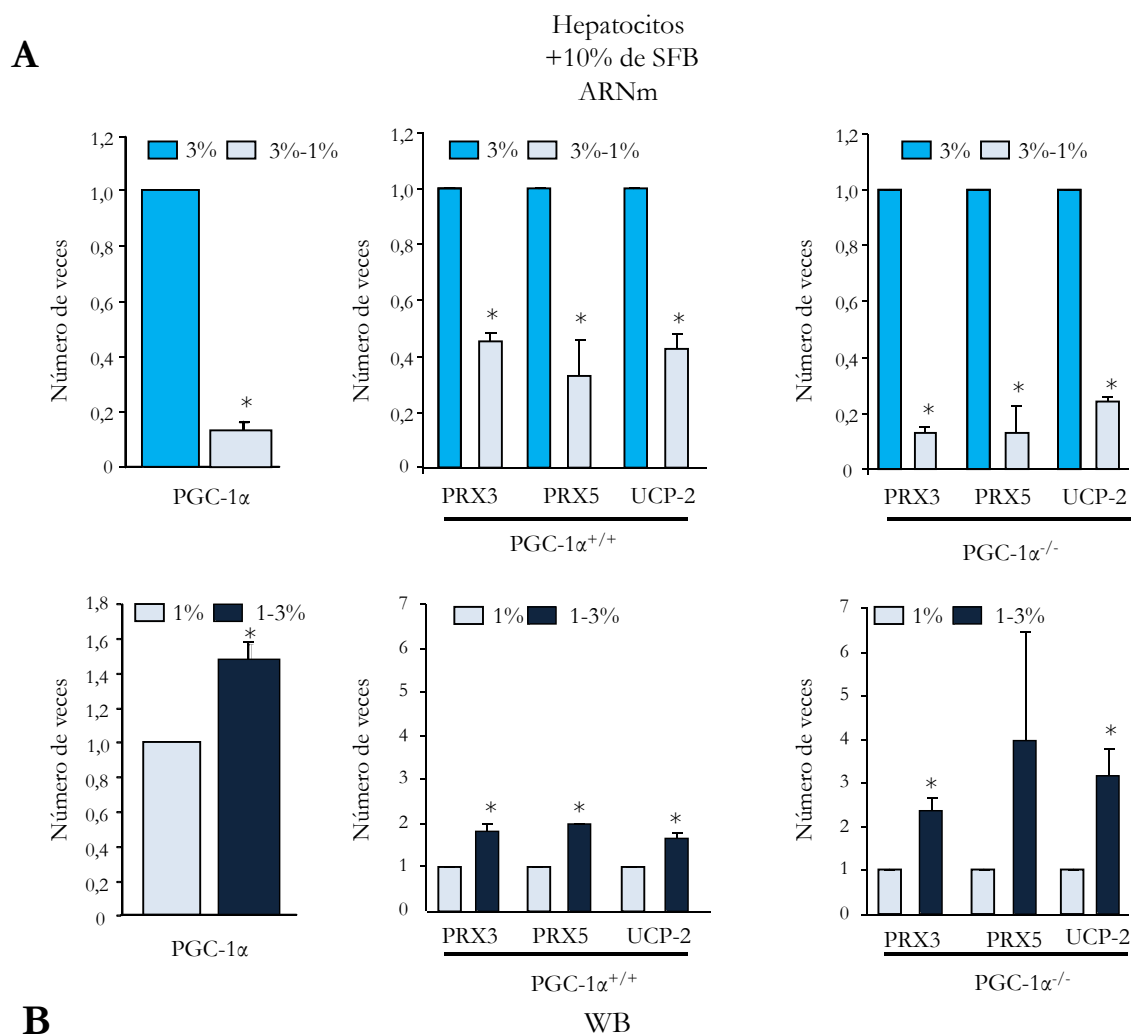


Figura 32. La activación de la expresión de PGC-1 α , es dependiente de la tensión de oxígeno en hepatocitos. Los hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$ tras el aislamiento se mantuvieron al 3% de tensión de oxígeno y tras 24 horas se cambiaron al 1% de tensión de oxígeno durante 14 horas (3%-1%) y se volvieron a cambiar a las condiciones de normoxia (1%-3%) durante 6 horas en presencia del 10% de SFB. **(A)** La expresión relativa de los genes indicados se analizó mediante qRT-PCR, utilizando la expresión de la β -actina como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó valor de 1. **(B)** Análisis mediante western blot. **(A)** Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

A continuación, se realizó el mismo tipo de ensayo, en ausencia de suero. Observando que al igual que ocurría en los ensayos con suero, los niveles de expresión de PGC-1 α se reducían tras una hipoxia sostenida (O₂, 14 h) y se recuperaban tras 6h de vuelta a normoxia (3% O₂). Este resultado indica que los cambios en los niveles de expresión de PGC-1 α , en respuesta a variaciones en la tensión de oxígeno, son independientes de la presencia o no de factores de crecimiento en el medio. (Fig. 33).

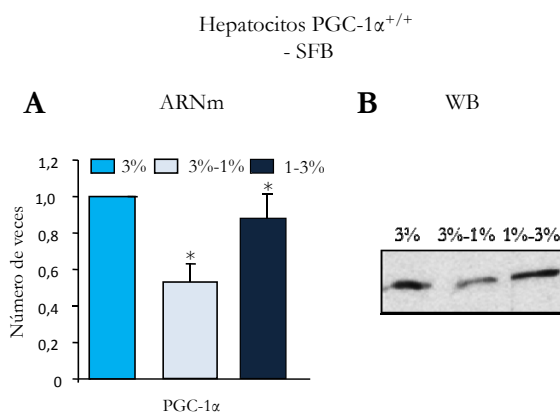


Figura 33. El cambio en el nivel de expresión de PGC-1 α , en respuesta a la tensión de oxígeno es independiente de los factores de crecimiento en hepatocitos. Los hepatocitos PGC-1 α ^{+/+} tras el aislamiento se mantuvieron al 3% de O₂ y tras 24 horas se cambiaron al 1% O₂ durante 14 horas (3%-1%) y a continuación, se volvieron a cambiar a las condiciones de normoxia (1-3%) durante 6 horas en ausencia de SFB. **(A)** La expresión relativa de los genes indicados se analizó mediante qRT-PCR, utilizando la expresión de la β -actina como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó valor de 1. **(B)** Análisis mediante Western Blot. **(A)** Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes.

Para valorar el impacto de estos cambios en los genes regulados por PGC-1 α se analizaron los cambios de expresión en el conjunto de genes que se estudió en los experimentos *in vivo* y que incluye fundamentalmente sistemas antioxidantes junto con Cyt c y VEGF. Los resultados mostraron que en ausencia de suero todos los sistemas analizados entre los que se encuentran MnSOD, Catalasa, Prx3, Prx5, UCP-2, Cyt C y VEGF, reducen su expresión tras una hipoxia sostenida (1% O₂, 14 h) y la recuperan tras 6 h de vuelta a la normoxia (3% O₂). Estos cambios se observan tanto a nivel de ARNm como de proteína (Fig. 34).

Para comprobar si estos cambios de expresión, asociados a variaciones en la tensión de oxígeno eran dependientes de PGC-1 α , se repitió este tipo de ensayos utilizando hepatocitos PGC-1 α ^{-/-}. Los resultados obtenidos tanto a nivel de ARNm como de proteína, indican que la disminución en la expresión, asociada a la hipoxia, ocurre también en ausencia de PGC-1 α en todos los casos, siendo en este caso más acentuada; lo que es más importante, es que la recuperación tras la reoxigenación no ocurre en absoluto en ausencia de PGC-1 α , observándose en cambio, una reducción aún mayor en los niveles de ARNm tras 6 h al 3% de O₂. Este resultado confirma que PGC-1 α es activo en ausencia de suero; además, indica que la inducción de PGC-

1 α tras la vuelta a la normoxia (3% 6 h) es fundamental para la inducción de los sistemas antioxidantes y otros sistemas regulados por PGC-1 α y que, durante la fase de hipoxia (1% O₂, 14 h) la disminución en los niveles de PGC-1 α no es la causa de la reducción en los sistemas antioxidantes en hipoxia, sino que, la actividad remanente de PGC-1 α podría atenuar la bajada en la expresión de estos sistemas en hipoxia (Fig. 34).

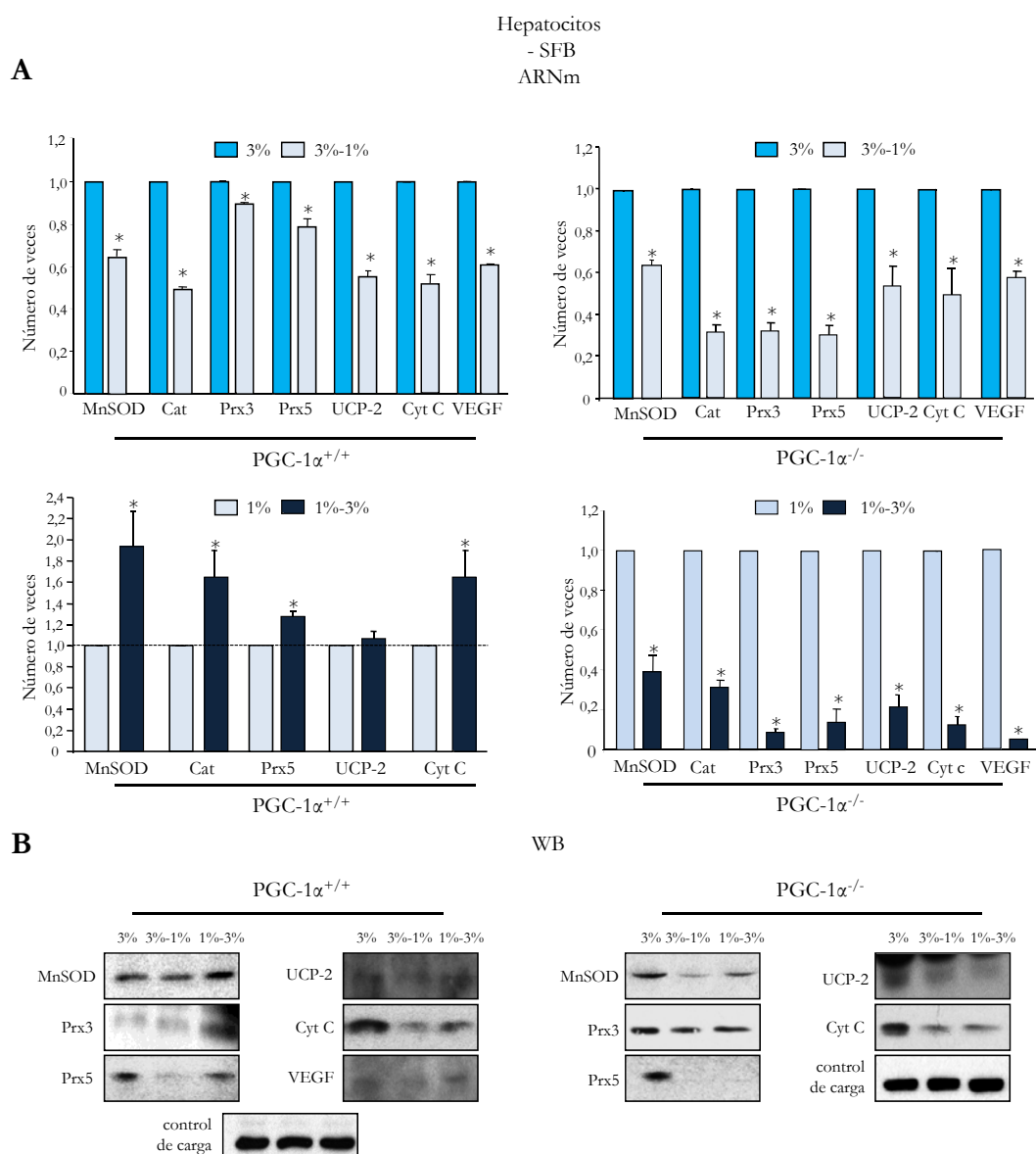


Figura 34. PGC-1 α es activo en ausencia de suero en hepatocitos. Los hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$, tras el aislamiento se mantuvieron al 3% de O₂ y tras 24 horas se cambiaron al 1% de O₂ durante 14 horas (3%-1%) y se volvieron a cambiar a las condiciones de normoxia (1-3%) durante 6 horas en ausencia de SFB. **(A)** La expresión relativa de los genes indicados se analizó mediante qRT-PCR, utilizando la expresión de la β -actina como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó valor de 1. **(B)** Análisis mediante Western Blot. **(A)** Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Finalmente decidimos estudiar los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de PGC-1 α y los sistemas antioxidantes en respuesta a cambios en la tensión de O₂. Diversos estudios sugieren que por una parte, los ROS producidos durante la reperfusion y por otra, la elevación de la concentración citosólica de Ca²⁺ y la activación de la Calcineurina A (Cn) en la fase de hipoxia, son mediadores fundamentales en la respuesta hepática a la IR (Yang et al, 2006; Vila-Petroff et al, 2007; Salas et al, 2010). Además, estudios realizados en sistemas no hepáticos han demostrado que PGC-1 α se induce tanto por Ca²⁺ como por hipoxia (Storey, 2003; Gutsaeva et al, 2008; Shoag & Arany, 2010; Zhu et al, 2010).

Para valorar la posible contribución de ambos factores a la inducción por PGC-1 α empezamos por estudiar el efecto del Ca²⁺ y la Cn en la expresión de PGC-1 α en hepatocitos primarios y en células FAO, que fueron tratados con ionóforo de Ca²⁺ (Io) para inducir la entrada de Ca²⁺ en la célula a distintos tiempos (2 y 6 h) en presencia o no de ciclosporina (CsA), un inhibidor de la Cn. Los resultados obtenidos indican que a tiempos cortos (2 h) se produce una inducción de PGC-1 α que se inhibe por CsA, mientras que a las 6 h el aumento en la expresión de PGC-1 α no se inhibe por CsA, que tiene, en este caso, un efecto estimulador sobre los niveles de PGC-1 α (Fig. 35). La inducción temprana dependiente de Cn es coherente con resultados publicados que indican que PGC-1 α se induce por CMKIV de manera Cn dependiente. Sin embargo, la observación de que la inducción tardía de PGC-1 α por Ca²⁺ no es dependiente de Cn sino más bien al contrario, es totalmente novedosa. Esta regulación podría ser debida a un efecto inhibitorio de NFAT (del inglés *nuclear factor of activated T cells*), sobre la expresión de PGC-1 α . NFAT es un factor de transcripción que media en la respuesta celular a la hipoxia al ser activado por Ca²⁺. Esta hipótesis está apoyada por experimentos independientes realizados por la Dra. Eva Cano, en los que se observó que en ensayos de transfección transitoria con gen reportero (luc) bajo el control del promotor de PGC-1 α , la isoforma constitutivamente activa NFAT3 tenía un efecto represor sobre la actividad del promotor (experimentos no mostrados, realizados por la Dra. Cano).

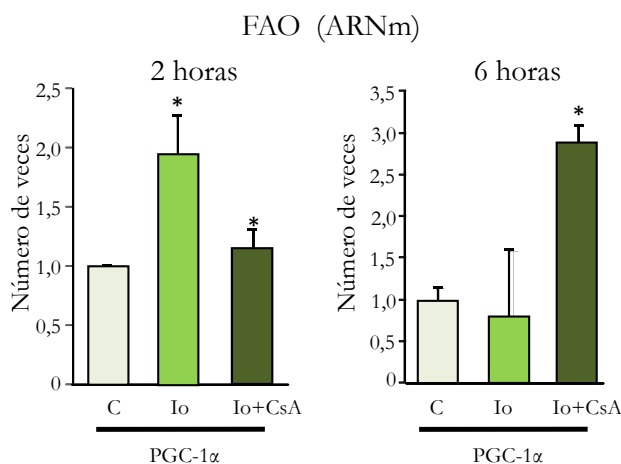


Figura 35. La activación de la expresión de PGC-1 α , es dependiente de la entrada de calcio en células FAO. Las células FAO se mantuvieron en ausencia y se trataron con ionóforo de Ca^{2+} 10 μM en ausencia o en presencia de ciclosporina 10 μM (CsA) durante los tiempos indicados. La expresión relativa de PGC-1 α fue determinada por qRT-PCR a partir de ARN total. La expresión de la β -actina fue utilizada como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó un valor de 1. Las gráficas muestran la Media \pm desviación estándar (SD) de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Con el fin de evaluar la contribución de la regulación por CsA de la expresión de PGC-1 α en respuesta a hipoxia en el hepatocito, se realizaron ensayos con hepatocitos estabilizados al 3 % de O_2 , tal y como se explicó en el apartado anterior, y se evaluó el efecto de la adición de CsA en la fase de hipoxia (1% O_2 , 14 h) adicionando la CsA en el momento del cambio en la tensión de O_2 . Los resultados obtenidos indican que la inhibición de la Cn cancela o reduce el efecto de la hipoxia sobre la expresión de PGC-1 α y todas las dianas analizadas, observándose este efecto tanto a nivel de ARNm como de proteína en hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$. Este resultado indica que al menos en este modelo “*in vitro*”, la activación de la Cn tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de PGC-1 α (Fig. 36).

El modelo de trabajo actual, pendiente de validar sería por tanto que la duración de la hipoxia determina si la entrada de Ca^{2+} permite la inducción de PGC-1 α (tiempos cortos, hasta 2 h) o si la entrada de Ca^{2+} induce NFAT (tiempos largos, hasta 4-12 h), lo que redundaría en una supresión de la expresión de PGC-1 α y de los sistemas antioxidantes.

Queda además pendiente de determinar la validez de esta hipótesis en el modelo *in vivo*. Cabe reseñar en este contexto que distintos estudios indican que en el hígado graso existe un estado pro-inflamatorio basal que podría acompañarse de un aumento en la actividad de NFAT.

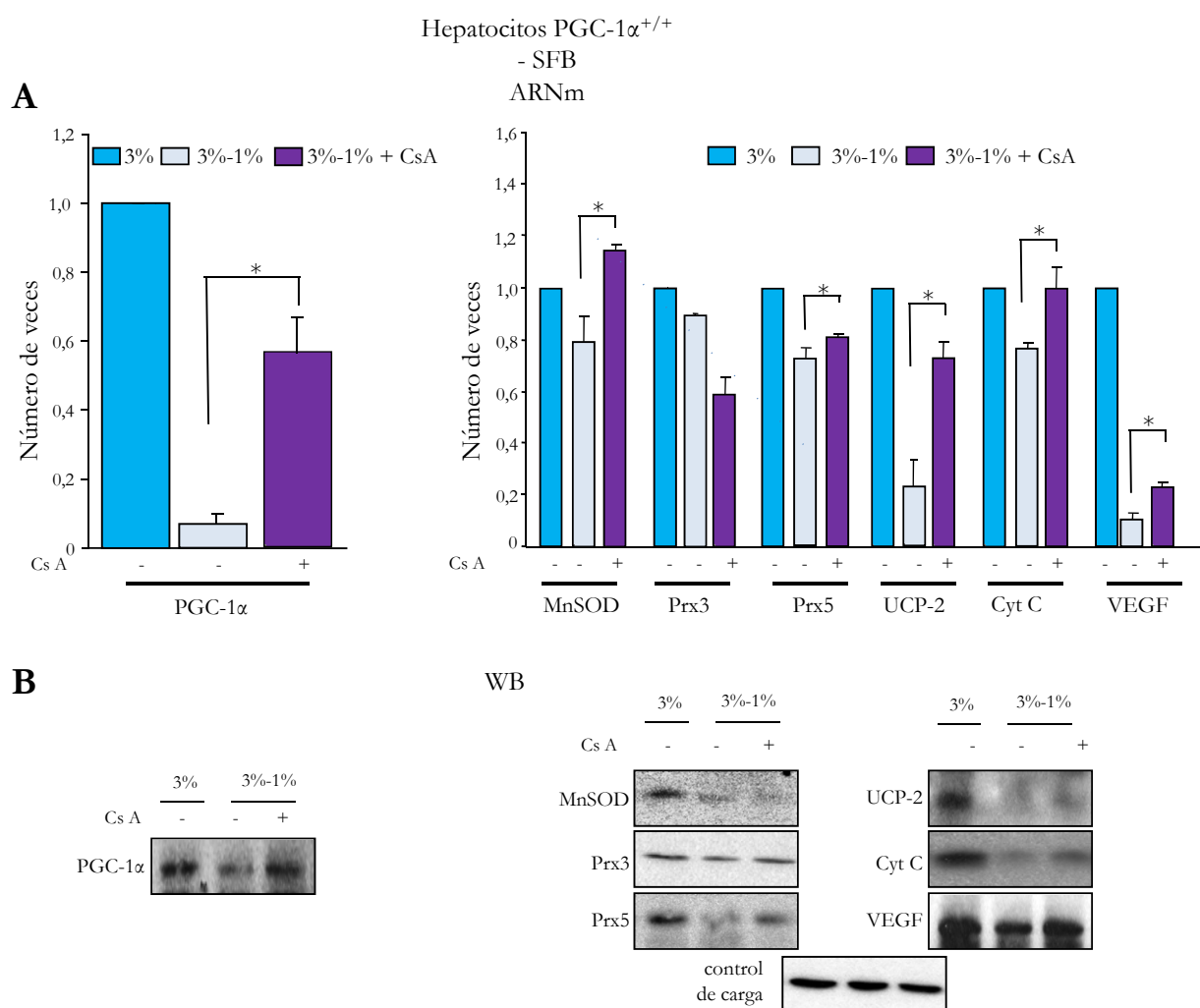


Figura 36. La activación de la Calcineurina tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de PGC-1 α

(A) Los hepatocitos PGC-1 $\alpha^{+/+}$ tras el aislamiento se mantuvieron al 3% de tensión de oxígeno y tras 24 horas se les añadió 1 μ M de ciclosporina (Cs A) y se cambiaron al 1% de tensión de oxígeno durante 14 horas que es lo que se considera hipoxia (3%-1%). La expresión relativa de PGC-1 α y del resto de dianas se analizó mediante qRT-PCR, utilizando el ARN de la β -actina como control endógeno. A las muestras de referencia se les asignó valor de 1. **(B)** Análisis mediante western blot. **(A)** Los resultados se muestran como la Media \pm desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

La observación de que la expresión de PGC-1 α se reduce en hipoxia tanto en presencia como en ausencia de suero, no concuerda en principio con estudios publicados en los que se determinó que la hipoxia inducía la expresión de PGC-1 α . Se podría especular acerca de la discrepancia de estos resultados que podría tener tres orígenes: 1.- Podría deberse a que se estudiaron sistemas celulares distintos. 2.- Podría deberse a que se utilizaron distintos tiempos de hipoxia. 3.- Podría deberse a que se utilizaron distintas concentraciones de oxígeno de partida. De estas tres posibilidades pensamos que la primera era muy improbable dado que la respuesta a la IR y la actividad de PGC-1 α son en líneas generales muy similares en todos los sistemas donde éstas se han estudiado. Para evaluar la segunda posibilidad llevamos a cabo un

ensayo de tiempos en los que se determinaron los niveles de PGC-1 α tras 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h y 24 h de hipoxia. Y no se pudo observar inducción de PGC-1 α a ninguno de estos tiempos (resultados no mostrados).

Finalmente nos planteamos que la diferencia podría deberse a que en nuestro caso se utiliza como tensión de O₂ de referencia el 3%, mientras que la mayor parte de los estudios de hipoxia utilizan como tensión de oxígeno de referencia el 20%. Por ello realizamos el mismo tipo de ensayos partiendo de una tensión de oxígeno al 20 % y evaluamos los niveles de expresión de PGC-1 α tras 14h al 3% o al 1% de O₂. El análisis de los cambios de expresión del ARNm de PGC-1 α mostró que estas células tras 14 h en 1% de oxígeno inducían la expresión de PGC-1 α . Sin embargo, los hepatocitos mantenidos 14 h en 3% de oxígeno no inducían sino que reducían la expresión de PGC-1 α (Fig. 37).

Concluimos por tanto que el grado de reducción en la tensión de oxígeno puede determinar si la hipoxia tiene un efecto inductor o supresor sobre la expresión de PGC-1 α . Queda por tanto pendiente evaluar cual es el efecto dominante *in vivo* o si ambos lo son dependiendo del sistema o del grado de hipoxia.

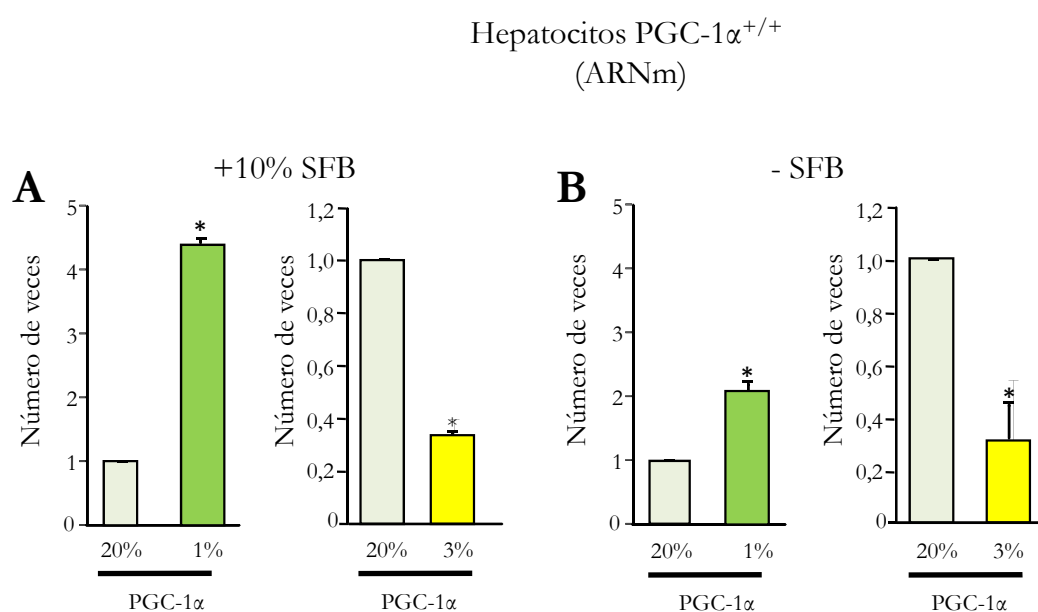


Figura 37. El grado de reducción de la tensión de oxígeno tiene efectos diferentes sobre la expresión de PGC-1 α Los hepatocitos PGC-1 α ^{+/+} tras el aislamiento se mantuvieron al 20% de tensión de oxígeno y tras 24 horas se cambiaron al 1% de tensión de oxígeno durante 14 horas, en presencia del 10% de SFB (A) o en ausencia de SFB (B). (A-B) La expresión relativa de PGC-1 α se analizó mediante qRT-PCR, utilizando la expresión de la β -actina como control de carga. A las muestras de referencia se les asignó el valor de 1. Los resultados se muestran como la Media \pm desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$.

Por último, como paso inicial para valorar el efecto de los ROS producidos en la fase de reoxigenación sobre la expresión de PGC-1 α , se valoró el efecto del antioxidante EU-89 sobre la inducción de la expresión tras la reoxigenación, (6 h al 3% de O₂ tras 14 h al 1% de O₂), observándose que la recuperación en los niveles de expresión de PGC-1 α tras la reoxigenación no ocurre en presencia de antioxidante, lo que sugiere que el aumento en el nivel de ROS es necesario para inducir la expresión de PGC-1 α (Fig. 38).

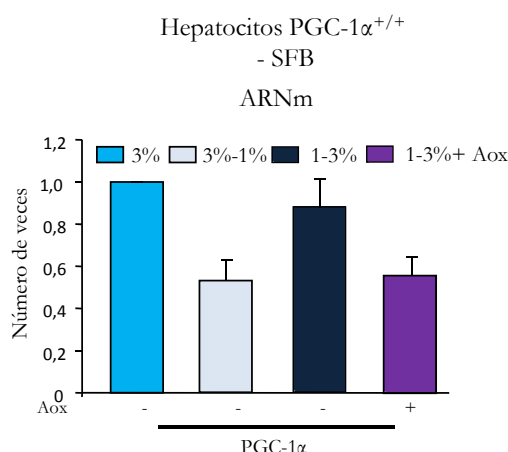


Figura 38. Los niveles de ROS son necesarios para inducir la expresión de PGC-1 α Los hepatocitos PGC-1 α ^{+/+} tras el aislamiento se mantuvieron al 3% de tensión de oxígeno y tras 24 horas se se cambiaron al 1% de tensión de oxígeno durante 14 horas, a continuación se añadió el antioxidante EU-89 100 μ M (Aox) y se cambió al 3% de tensión de oxígeno durante 6 horas. La expresión relativa de PGC-1 α s se analizó mediante qRT-PCR, utilizando la expresión de la β -actina como control de carga. A la muestras de referencia se les asignó el valor de 1. Los resultados se muestran como la Media \pm desviación estándar de un mínimo de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Control metabólico y respuesta al daño en el ADN

TLS se descubrió originalmente como parte de una translocación oncogénica en liposarcomas humanos que genera una proteína de fusión con el factor de transcripción CHOP (Croizat et al, 1993; Rabbitts et al, 1993). Estudios posteriores vinieron a demostrar que TLS era importante en la regulación de la estabilidad genómica (Perrotti et al, 1998; Hicks et al, 2000; Gardiner et al, 2008) pudiendo actuar como regulador transcripcional (Hallier et al, 1998; Powers et al, 1998; Uranishi et al, 2001; Law et al, 2006; Wang et al, 2008). Por otra parte, estudios recientes indican que varias mutaciones en TLS están asociadas al desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica familiar (ALS). ALS es una enfermedad neurodegenerativa, para la cual se ha propuesto una etiología asociada a un tipo de disfunción mitocondrial, acompañada del desarrollo de estrés oxidativo (Blair et al, 2009; Chio et al, 2009; Kwiatkowski et al, 2009; Neumann et al, 2009; Tateishi et al, 2009; Vance et al, 2009; Groen et al, 2010; Syriani et al, 2011).

Por lo tanto, la evidencia existente en el momento de iniciar el estudio indicaba que TLS era relevante en la respuesta al daño genotóxico por mecanismos aún muy poco caracterizados y parecía indicar que TLS podría participar en la función mitocondrial. La identificación de TLS en un ensayo de doble híbrido en levaduras contra PGC-1 α , nos llevó a plantearnos que la posible actividad mitocondrial de TLS podría estar mediada por su interacción con PGC-1 α , un regulador clave de la actividad mitocondrial.

Con el fin de validar esta hipótesis empezamos por comprobar si la interacción entre PGC-1 α y TLS era detectable en hepatocitos y decidimos mapear los dominios implicados, realizando tanto ensayos *in vitro* con proteínas purificadas, como ensayos en células. Los resultados obtenidos indicaban que la región de TLS que media en su interacción con PGC-1 α , corresponde a la región, RGG3, rica en tripletes de Arg-Gly-Gly, situada en su extremo carboxilo terminal. Estudios previos indicaban que dicha región podía mediar en las interacciones proteína-proteína (Cartegni et al, 1996; Bouvet et al, 1998) además de regular la especificidad del dominio de unión a RNA adyacente (Burd & Dreyfuss, 1994; Lerga et al, 2001).

Del mismo modo, la región de PGC-1 α que interacciona con TLS se localiza en su dominio CTD pero no requiere ni el dominio de unión a RNA (RRM), ni la región rica en serinas y argininas (SR), localizándose por tanto la región de interacción entre los aa 710-797 de la proteína. Se ha descrito que el dominio CTD de PGC-1 α es el dominio implicado en la interacción con el factor de transcripción FoxO1, dicha interacción está implicada en el control de la expresión de los genes de gluconeogénesis en el hígado (Puigserver et al, 2003) y con el factor FoxO3a con el que regula los genes de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial en células endoteliales (Olmos et al, 2009).

Los estudios de actividad transcripcional con gen reportero sirvieron para determinar que TLS puede actuar como un cofactor de PGC-1 α , regulando positivamente su actividad transcripcional y dicha regulación depende de la interacción directa entre las dos proteínas.

Una vez determinado que TLS era un cofactor de PGC-1 α nos propusimos estudiar si este efecto era un efecto general sobre todos los genes regulados por PGC-1 α o era un efecto específico de gen. Empezamos por valorar un grupo conocido de genes diana de PGC-1 α observando que TLS sólo es capaz de regular la expresión de los genes del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial, no así la expresión de los genes implicados en biogénesis mitocondrial. Los ensayos de ChIP vinieron a demostrar que TLS se asocia directamente con las regiones promotoras de *sod2*, *prx3*, *prx5*, *catalasa* y *ucp-2*, siendo éstas, las mismas regiones promotoras para las que se había descrito previamente una asociación con PGC-1 α (Valle et al, 2005). No se pudo evaluar la posible asociación con las regiones promotoras de *trx-2* ni de *trx2*, debido a la dificultad de diseñar oligonucleótidos adecuados para las regiones promotoras de estos genes.

Para confirmar la relevancia funcional de TLS, se evaluó que efecto tiene la ausencia de TLS sobre los niveles de expresión de los genes de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de expresión de estos genes se encuentran disminuidos a nivel de ARNm para todos los genes analizados. Esta disminución viene acompañada de una reducción en los niveles de proteínas, para todos los casos excepto para la proteína TrxR2 que se encuentra aumentada. Una posible explicación a este hecho es que sobre TrxR2 tengan lugar modificaciones posttranscripcionales que alteren la síntesis o la estabilidad de la proteína, quizás debido al aumento en los niveles de ROS que se observa en ausencia de TLS.

A continuación, se evaluó la posible cooperación entre TLS y PGC-1 α en la regulación de los genes antioxidantes, comprobándose que los dos factores actúan de forma cooperativa y mutuamente dependiente. La cooperatividad y la dependencia mútua se hace particularmente evidente cuando se analizan los niveles totales de ROS presentes en la célula ya que ni TLS ni PGC-1 α son capaces de reducir los niveles de ROS en ausencia del otro.

Se ha comprobado que el efecto de TLS sobre los niveles de ROS es debido al menos en parte a un aumento en la capacidad de detoxificación de ROS. Este hecho se ha probado por dos técnicas independientes, en primer lugar con el tratamiento con DMNQ, que sirve para evaluar la capacidad general de detoxificación celular de ROS de origen mitocondrial y en segundo lugar mediante la medida directa de la actividad SOD y catalasa. Además, es posible que TLS actúe también disminuyendo la producción de ROS, que podría tener lugar en los complejos I y III de la CTE de la membrana interna mitocondrial, este hecho sería coherente con la inducción observada de la proteína desacoplante UCP-2 en los experimentos realizados, sin embargo, no se han realizado experimentos encaminados a demostrar este hecho, como el empleo de inhibidores específicos del complejo I como la rotenona, descritos en la literatura (Li et al, 2003).

El incremento en la actividad mitocondrial resulta en un incremento en la producción de ROS que puede ser perjudicial para las células. Por tanto, la inducción de sistemas antioxidantes, que regulen la acumulación de ROS en la célula, es crucial, sobre todo en aquellas situaciones en las que la β -oxidación está activa, es el caso por ejemplo, del tejido hepático, el músculo o el endotelio vascular; en este último se ha

descrito que PGC-1 α coordina la inducción de la función mitocondrial con un incremento de las enzimas del sistema de detoxificación mitocondrial (Valle et al, 2005).

Debido a que TLS está implicado en la regulación de los genes antioxidantes, quisimos valorar el efecto que tiene el estrés oxidativo sobre los niveles y la actividad de TLS. Los resultados obtenidos muestran que efectivamente el estrés oxidativo aumenta los niveles de expresión de TLS y aunque no parece regular la interacción entre TLS y PGC-1 α , el perfil de inducción de la expresión de los genes antioxidantes se ve alterado. En condiciones de estrés oxidativo debido a altas concentraciones de glucosa, la cooperatividad entre TLS y PGC-1 α , parece ser mayor para algunos genes, menor para otros y no se ve alterada en algunos casos. La explicación a este hecho nos es a día de hoy desconocido.

El hecho de que la concentración alta de glucosa genere estrés oxidativo en la célula, es debido a que cuando el consumo de calorías es superior al gasto de energía, se produce un aumento de la actividad del ciclo del ácido cítrico, que genera un exceso de NADH mitocondrial que inhibe la entrada de sustratos energéticos a la mitocondria. Cuando el nivel de metabolitos es muy alto, hace que la inhibición de los mecanismos de entrada en la mitocondria no sea efectiva, lo que genera un incremento en la producción de ROS en la mitocondria, al no estar acoplado el flujo electrónico de la CTE a la síntesis de ATP (Van Gaal et al, 2006). Resultados previos de nuestro grupo muestran que las altas concentraciones de glucosa inducen a nivel de ARNm pero no de proteína, varios sistemas antioxidantes de manera independiente de PGC-1 α , pero dicha inducción no se refleja en un aumento de la capacidad antioxidante celular y no puede compensar el aumento en la generación de ROS mitocondriales.

Se han descrito varios mecanismos a través de los cuales el estrés metabólico y el estrés oxidativo regulan la expresión o la actividad de PGC-1 α . Entre los que cabe destacar, la inducción de PGC-1 α a nivel de expresión génica, en respuesta tanto a la restricción calórica por CREB mediado por glucagón y por FoxO mediado por la baja concentración de insulina, como en respuesta al incremento en los niveles de ROS (Herzig et al, 2001; Puigserver & Spiegelman, 2003; Kumashiro et al, 2008). Otro de los mecanismos propuestos, es la activación o inactivación de PGC-1 α debido a modificaciones posttranscripcionales, como es el caso de la proteína AKT que inactiva PGC-1 α por fosforilación en respuesta a la insulina, la proteína AMPK que activa PGC-1 α por fosforilación cuando se inducen los niveles de AMP, o por SIRT1 que activa PGC-1 α por deacetilación cuando suben los niveles de NAD⁺ y en respuesta a ROS (St-Pierre et al, 2006; Jager et al, 2007; Irrcher et al, 2009). Dado que la actividad de TLS está también regulada por cambios en el metabolismo y en ROS permite hipotetizar con la idea de que algunos de estos sistemas pueden estar también implicados de forma directa o indirectamente en la regulación de los niveles y actividad de TLS, sin embargo hasta la fecha no se han iniciado estudios que permitan valorar esta posibilidad.

Como se puede comprobar en los resultados mostrados previamente, existe una dependencia mutua entre la actividad de TLS y PGC-1 α en la regulación de los sistemas antioxidantes. Sin embargo, es

importante mencionar que existe una excepción que es la MnSOD. Los ensayos de supresión de la expresión de TLS en hepatocitos PGC-1 α ^{+/+} y PGC-1 α ^{-/-} mostraron una alta variabilidad en la expresión de la enzima MnSOD, que no permite concluir si las diferencias observadas son significativas o no lo son. El origen de esta variabilidad, puede ser debido tanto a un grado menor de dependencia, como al propio proceso experimental, ya que diferentes grupos de experimentos respondieron de manera muy distinta a la supresión de la expresión de TLS. Para evaluar la dependencia mutua entre TLS y PGC-1 α sería necesario la realización de experimentos con modelos *in vivo*. Este tipo de ensayos se encuentran en marcha y en ellos se evaluará el efecto que tiene sobre el tejido hepático la sobreexpresión o la supresión de TLS en ratones PGC-1 α ^{+/+} y PGC-1 α ^{-/-}. En cualquier caso, cabe destacar que la regulación transcripcional de *sod2* está bastante bien caracterizada y si se analiza con detenimiento lo descrito en la literatura, podremos encontrar que su expresión está regulada por diversos factores de transcripción entre ellos PGC1- β , un homólogo de PGC-1 α (Zelko et al, 2002; Spiegelman, 2007), cuya interacción con TLS a día de hoy, no ha sido evaluada pero podría tener un efecto compensatorio sobre la ausencia de PGC-1 α .

Un resultado que es importante resaltar es que la regulación de los genes del sistema de detoxificación mediada por TLS y PGC-1 α no es debido a cambios en la localización subcelular de TLS en el hepatocito. Como ya se comentó previamente TLS se localiza entre el citosol y el núcleo ya que participa en el transporte del ARNm del núcleo al citosol (Fujii & Takumi, 2005). En concreto, se ha descrito que TLS se localiza en los focos nucleares que podrían corresponder a sitios de activación de la transcripción o procesamiento del ARNm y es una localización clásica de los factores de transcripción implicados en el proceso de *splicing* como es el caso de TLS (Alliegro & Alliegro, 1996; Yang et al, 1998; Meissner et al, 2003). Los resultados obtenidos indican que TLS se distribuye de manera similar en el núcleo y en el citoplasma de los hepatocitos en ausencia o en presencia de PGC-1 α , por tanto el deterioro en la actividad de TLS, en ausencia de PGC-1 α , sobre los genes del sistema de detoxificación mitocondrial no puede ser atribuido a cambios en la localización subcelular de TLS.

Este grupo de resultados viene por tanto a demostrar que TLS no sólo responde al daño al ADN induciendo la parada de ciclo sino que interviene directamente induciendo sistemas de protección que previene la generación del daño oxidativo. Además, el hecho de que la actividad de TLS sobre los sistemas antioxidantes dependa de la rpresencia de PGC-1 α , indica que sólo en aquellas condiciones en las que la célula presenta un metabolismo oxidativo activo se va a producir la regulación de los sistemas antioxidante por TLS. La posible relación entre el control metabólico y el daño genotóxico se sustenta por el análisis funcional del *array*, que muestra que la actividad de TLS modula tanto genes del control del metabolismo celular como genes relacionados con el cáncer y con el control del ciclo celular y por otro lado, acentúa la importancia de PGC-1 α para el control de aproximadamente el 80% de los genes regulados positivamente por TLS. Entre otros, a modo de ejemplo, dos de los genes regulados por TLS de forma dependiente de PGC-1 α e implicados en el metabolismo celular, son fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa 6 fosfatasa (G6P). Ambos enzimas claves de la gluconeogénesis que se conoce que están reguladas por PGC-1 α

(Herzig et al, 2001). En este sentido es interesante comentar que, recientemente, se ha descrito que la actividad del promotor de ambos genes se reduce en respuesta a la radiación ultravioleta y a la radiación ionizante que promueven la generación de ROS, lo que parece indicar que la expresión de la *g6p* y *pepk* es sensibles al daño genotóxico (Kim et al, 2011). Además, en este mismo trabajo indican que los niveles de PGC-1 α se reducen en respuesta a la radiación de forma dependiente y esta disminución está mediada por la degradación de PGC-1 α por el proteosoma (Kim et al, 2011) lo que podría justificar la reducción en la expresión de *g6p* y *pepk*. Este tipo de evidencias apoyan la fuerte conexión que parece existir entre el control metabólico y el control del daño al ADN.

Otro tipo de estudios muy recientes apuntan también a la existencia del vínculo entre el control metabólico y el daño genotóxico. Cabe resaltar los estudios relativos a la quinasa ATM, fundamental en la respuesta al daño al ADN que se conoce que regula positivamente la actividad de TLS (Gardiner et al, 2008). Un artículo reciente propone que ATM induce biogénesis mitocondrial de manera dependiente de AMPK que como ya se ha comentado previamente es un sensor metabólico y activador de PGC-1 α (Fu et al, 2008). Además, otra proteína importante para el control génico de la respuesta al daño en el ADN es p53, un conocido factor transcripcional cuya pérdida desencadena el desarrollo de tumores, para el que se ha descrito recientemente que se encuentra asociado al control de la actividad mitocondrial y al control de los ROS, probablemente de manera dependiente de PGC-1 α debido a que ratones deficientes en p53, muestran un número reducido de mitocondrias acompañado de niveles bajos de expresión y actividad de PGC-1 α (Hussain et al, 2004; Bae et al, 2005; Matoba et al, 2006; Saleem et al, 2009). Aunque no se ha descrito la existencia de mecanismos de regulación cruzada entre p53 y TLS, sí que se ha identificado a p53 como un marcador biológico que predice el desarrollo del liposarcoma, en el que se ha caracterizado la presencia de la proteína de fusión oncogénica TLS-CHOP (Antonescu et al, 2001) sugiriendo una posible conexión funcional entre ambos.

Por otra parte, múltiples trabajos en diversos organismos demuestran que la limitación al acceso de nutrientes, promueve tanto la β -oxidación de los ácidos grasos para aumentar el rendimiento energético de los metabolitos disponibles, como la resistencia frente al daño genotóxico (Albers et al, 2007; Panowski & Dillin, 2009; Zuin et al, 2010) esto indica que el estrés oxidativo y consecuentemente el daño genotóxico, prevalece en aquellas situaciones en las que la β -oxidación está muy disminuida aunque los mecanismos implicados no están en general muy bien caracterizados (Burhans & Heintz, 2009; Seyfried & Shelton, 2010). En mamíferos, la restricción calórica incrementa la actividad de proteínas como sirt1 que ha sido implicado en el mantenimiento de la estabilidad genómica, la supervivencia celular, así como el control del metabolismo oxidativo y de los ROS (Cohen et al, 2004; Kobayashi et al, 2005; Ghosh, 2008; Prozorovski et al, 2008). Teniendo en cuenta que sirt1 parece regular positivamente la actividad de PGC-1 α , es probable que esta regulación también sea importante en la respuesta dependiente de PGC-1 α y TLS en el daño al ADN. Sin embargo, la relación entre estas dos rutas moleculares aún permanece sin esclarecer, ahora bien, los resultados

obtenidos identifican la interacción y la dependencia funcional entre dos factores que modulan ambas rutas regulatorias.

Un estudio reciente apoya la existencia de una relación funcional entre la estabilidad genómica, la respuesta metabólica y la regulación frente al estrés oxidativo. Este trabajo demuestra que la disfunción telomérica reprime la expresión de PGC-1 α de manera dependiente de p53. Este resultado no sólo establece un vínculo entre la actividad de PGC-1 α y p53 sino que además, predice que esta relación es clave en la integración de la respuesta frente al estrés metabólico con el estrés oxidativo (Sahin et al, 2011). En esta línea, cabe recordar que la propia actividad telomerasa, que controla la senescencia e inmortalización celular se regulan por ROS. Finalmente, es importante resaltar que *tert*, el componente ARN de la telomerasa, fue identificado en los ensayos de *arrays* como un gen cuya expresión se regula negativamente por TLS, de manera dependiente de PGC-1 α , a la vista está que este resultado es muy interesante, pero es necesario validarlo por q PCR.

Estudios recientes han propuesto que sirt1 protege frente al estrés promovido por oxidantes mediante la inducción de la expresión de la MnSOD y la catalasa (Alcendor et al, 2007; Hasegawa et al, 2008; Tanno et al, 2010). Por otra parte, sirt1 regula la actividad de PGC-1 α en diferentes tejidos en respuesta necesidades metabólicas (Nemoto et al, 2005; Rodgers et al, 2005; Canto & Auwerx, 2009; Canto & Auwerx, 2010). Así por ejemplo PGC-1 α y sirt1 parecen actuar de forma conjunta en la regulación de los procesos de gluconeogénesis y de la β -oxidación de ácidos grasos en el hígado en condiciones de ayuno (Rodgers et al, 2005; Rodgers & Puigserver, 2007) Por tanto, estos datos contribuyen a que PGC-1 α podría actuar como vínculo entre la regulación metabólica mediada a través de sirt1y la respuesta al estrés genotóxico promovido por TLS.

Como conclusión a esta parte del trabajo, podemos decir que creemos haber identificado una interacción clave entre la respuesta al estrés oxidativo y al estrés metabólico que hace que la respuesta celular al estrés dependa del estado metabólico en el que se encuentre la célula, siendo esta una posible explicación al hecho de que haya mayor incidencia de tumores en aquellos paciente con disfunción metabólica. Ésto, unido a trabajos recientes, que muestran que PGC-1 α induce apoptosis en líneas tumorales y que puede actuar como supresor tumoral, al igual que TLS, hace aún más evidente esta hipótesis (Kong et al, 2009).

PGC-1 α es un mediador en el preconditionamiento isquémico

El trasplante hepático constituye en la actualidad el tratamiento más efectivo para las enfermedades hepáticas graves de mal pronóstico a corto plazo. El órgano del donante sufre durante el trasplante la interrupción del flujo sanguíneo, que impide el acceso del órgano al O₂ y a los nutrientes, lo que compromete la viabilidad del tejido. Además, el repentino restablecimiento del flujo sanguíneo, durante la reperusión, agrava la lesión producida a nivel celular (Serracino-Inglott et al, 2001; Montalvo-Jave et al, 2008). El tiempo necesario para trasplantar el órgano y las complicaciones que surgen de la propia cirugía, hacen que el tiempo durante el cual el órgano permanece en hipoxia pueda ser muy largo (Powner, 2004; Montalvo-Jave et al, 2008). Es posible que por este motivo, el daño hepático, consecuencia del proceso denominado de isquemia-reperusión (IR), sea la principal causa de fallo hepático tanto en la fase aguda como en la fase crónica, tras los problemas inmunológicos (Powner, 2004).

Durante la fase isquémica concurren varias alteraciones a nivel celular, que promueven la muerte del hepatocito. Los bajos niveles de O₂ no permiten que funcione la CTE, por lo que se induce el metabolismo glicolítico, pero este proceso pronto pierde efectividad, dado que no se retira el lactato, lo que disminuye el pH. La consecuencia es una disminución en la concentración de ATP, que lleva a una pérdida de actividad en las bombas de iones, lo que induce una acumulación citosólica de Ca²⁺. Tras la súbita entrada de O₂ en la fase de reperusión se produce además, un fuerte aumento en la producción mitocondrial de ROS. Los elevados niveles de ROS, los bajos niveles de pH y la alta concentración de Ca²⁺ intracelular son factores concurrentes en la muerte del hepatocito, que puede producirse tanto por necrosis como por apoptosis, dependiendo de la severidad y el tiempo de isquemia (Silverman & Stern, 1994; Halestrap et al, 2004; Solaini & Harris, 2005; Halestrap, 2009a; Halestrap & Pasdois, 2009).

El éxito en el trasplante radica en buena parte, en la capacidad de supervivencia del órgano transplantado a la IR. El nivel de daño por IR se encuentra fuertemente asociado al nivel de ROS al que se somete al hepatocito, con la consiguiente activación de los procesos apoptóticos y necróticos (Serracino-Inglott et al, 2001; Jassem & Heaton, 2004; Powner, 2004; Montalvo-Jave et al, 2008). Por tanto, conocer como se regulan los niveles de los sistemas de protección frente a estrés oxidativo encargados de eliminar los ROS producidos durante la IR podría por tanto permitir el desarrollo de protocolos que reduzcan el daño producido por la IR. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto la implicación de PGC-1 α en la regulación de la expresión de genes de protección frente a estrés oxidativo de origen mitocondrial (Valle et al, 2005), de manera dependiente de su interacción con el factor de transcripción FoxO3a (Olmos et al, 2009). Por tanto nos propusimos estudiar el papel de la regulación mediada por PGC-1 α de sistemas antioxidantes en el daño hepático producido por la IR.

El preconditionamiento isquémico es un protocolo de inducción de sistemas de protección celular frente a la lesión generada por el proceso de IR, que parece mediado al menos en parte, por los ROS generados tras la reperusión, debido a que tratamientos con antioxidantes previenen el preconditionamiento

isquémico (Rudiger et al, 2003; Schauer et al, 2003; Pasupathy & Homer-Vanniasinkam, 2005) Los ROS son sin embargo, sólo uno de los muchos mediadores propuestos para el PCI, estando en muchos casos muy poco claro si es causa o si es efecto del proceso. Teniendo en cuenta que PGC-1 α se induce tanto en respuesta a hipoxia, como en respuesta a los ROS, dos de los factores claves del proceso de IR y es capaz de inducir genes de detoxificación de ROS, generados durante el proceso de IR, nos planteamos si PGC-1 α se inducía en respuesta a la IR y si ésta inducción era relevante en la protección del hígado mediado por el PCI.

Como ya se ha descrito previamente los hígados de los donantes que presentan esteatosis hepática responden peor al trasplante al PCI (Ploeg et al, 1993; Franchello et al, 2009). La sobrealimentación y el síndrome metabólico van acompañadas de una reducción en la actividad de PGC-1 α en el hígado (Patti et al, 2003; Yang et al, 2003; Semple et al, 2004; Aharoni-Simon et al, 2011) Debido a estos motivos nos preguntamos en este estudio si la baja actividad de PGC-1 α en los hígados esteatóticos podía ser la causa de su mala respuesta a la IR (Pessayre, 2007).

Para valorar esta hipótesis se utilizaron dos modelos murinos de forma paralela, uno de deficiencia en PGC-1 α y otro de hígado graso generado por la alimentación de los ratones con dieta grasa durante 7 semanas.

Empezamos por determinar si la expresión de PGC-1 α se encontraba efectivamente disminuída en ratones con hígado graso y si era así, cómo se veían afectados los genes diana de PGC-1 α y en particular genes implicados en la detoxificación de ROS de origen mitocondrial. Los resultados obtenidos muestran que efectivamente, no sólo la expresión de PGC-1 α sino también varios genes de detoxificación mitocondrial y otros genes regulados por PGC-1 α como Cyt C (Wu et al, 1999) y VEGF (Arany et al, 2008) presentan una expresión reducida en los ratones con hígado graso. El hecho de que esta baja expresión sea debida a la reducción en los niveles de PGC-1 α viene apoyada por la observación de que el hígado proveniente de ratones PGC-1 α ^{-/-} presenta un patrón de expresión de los genes del sistema de detoxificación muy similar al que presentan los ratones con hígado graso, con excepción de UCP-2, cuya expresión está aumentada en hígados grasos y disminuída en el hígado de ratones PGC-1 α ^{-/-}. La inducción de UCP-2 está en consonancia con lo descrito por diversos autores que han mostrado previamente que la expresión de UCP-2 se encuentra aumentada en el hígado graso tanto en humanos como en modelos animales (Uchino et al, 2004; Fulop et al, 2006; Jiang et al, 2008). La inducción de UCP-2 podría deberse a que los ácidos grasos libres aumentan la expresión y actividad de UCP-2 por mecanismos aún poco conocidos.

Durante el proceso de IR se genera una gran cantidad de ROS que se han propuesto como mediadores en el PCI (Alchera et al, 2010; Theodoraki et al, 2011). Como primer paso, para valorar la posible actividad de PGC-1 α en este proceso, se analizó si PGC-1 α y el sistema de detoxificación mitocondrial se inducía durante el proceso de IR. Los resultados obtenidos muestran que en los ratones control se produce un aumento de PGC-1 α durante la fase de IR y este aumento es mucho mayor si se utiliza el protocolo con

PCI, esta inducción va acompañada de una mayor expresión de varios sistemas antioxidantes probablemente mediada por PGC-1 α , ya que esta inducción no ocurre en ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ sometidos al mismo protocolo con PCI.

La relevancia fisiopatológica del estudio vino apoyada por los resultados obtenidos con el modelo de esteatosis hepática, en este caso, el protocolo de PCI no dió lugar a una inducción significativa de la expresión de PGC-1 α y además, la inducción de los sistemas antioxidantes fue muy leve e incluso para varias de las enzimas objeto de estudio fue suprimida. Dado que el patrón de respuesta del hígado graso es muy similar al del hígado de ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ y teniendo en cuenta que PGC-1 α no se induce en hígado graso tras el PCI, podemos concluir que la inducción de PGC-1 α en el PCI probablemente media en la inducción de los sistemas antioxidantes durante el PCI para eliminar los ROS generados durante la reperusión. Además, posiblemente, la falta de inducción de PGC-1 α en el hígado graso sea la causa de la mala respuesta de este hígado al trasplante, ya que al estar expuesto a niveles muy altos de ROS debido a la falta de antioxidantes, que reduzcan los ROS generados durante el proceso de IR.

Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que el PCI puede estar mediado por un aumento en la capacidad antioxidante de la célula dependiente de la inducción de PGC-1 α , probablemente debido a la generación de pequeñas cantidades de ROS no patológicas que hacen que se produzca la inducción de PGC-1 α . Esta idea apoya la hipótesis de que el PCI está muy ligado a la producción de ROS y de que son los ROS los encargados de inducir los mecanismos de protección en el hígado frente a la lesión por IR. (Rudiger et al, 2003; Kim et al, 2010) Esta regulación es coherente con resultados previos que indicaban que PGC-1 α se induce tanto por hipoxia como por ROS (St-Pierre et al, 2006; Arany et al, 2008) y permite proponer que la inducción de sistemas antioxidantes dependientes de ROS, de la hipoxia y de PGC-1 α pueda ser determinante en la protección que se produce durante el PCI. Falta sin embargo, por elucidar cual sería la ruta realmente implicada en la inducción de PGC-1 α durante el proceso de PCI.

Para validar esta hipótesis y para comprobar si los bajos niveles de antioxidantes asociados a la ausencia de PGC-1 α podían explicar la respuesta de un hígado graso a la IR, decidimos comparar el grado de lesión y el tipo de daño hepático producido en un hígado graso por la IR, con el producido en el hígado de ratones deficientes en PGC-1 α . Los resultados obtenidos sobre cortes de tejido hepático muestran que como ya se había descrito previamente, el PCI reduce la lesión producida por la IR en ratones con hígado normal, sin embargo en los ratones con hígado graso, el PCI agrava la lesión apareciendo un mayor número de hemorragias, focos inflamatorios, núcleos apoptóticos y grandes zonas de alteraciones estructurales, que pueden estar relacionados con el desarrollo de procesos fibróticos. El resultado más sorprendente del trabajo es el que muestra que los ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ se comportan como los ratones con hígado graso, frente a la lesión por IR a pesar de no mostrar acumulación de grasa en el hígado. Los ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$ no responden al y la extensión y gravedad de las lesiones es muy similar a la observada en los hígados grasos de ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$. Este resultado nos permite hipotetizar con la idea de que la baja actividad de PGC-1 α en el

hígado graso es la responsable de la mala respuesta del hígado graso frente a la lesión por IR, debido a que se reduce la capacidad antioxidante celular y el sistema no es capaz de reducir los ROS generados durante la reperusión. Sin embargo, serían necesarios experimentos de ganancia de función sobre los hígados grasos para corroborar esta hipótesis. Para ello, se podría sobreexpresar PGC-1 α en el hígado graso, inyectando adenovirus recombinantes en la arteria de la cola del ratón, con el fin de determinar si la sobreexpresión de PGC-1 α podría mejorar el comportamiento del hígado graso frente a la IR y disminuir el tamaño de las lesiones.

La valoración de la actividad de las enzimas transaminasas GPT y GOT se utiliza como un indicador del daño hepático. En general, en los resultados mostrados, las actividades obtenidas para los distintos grupos de ratones, correlaciona bien con la gravedad de las lesiones observadas en los cortes de tejido. La relación entre el tamaño de lesión y los valores determinados para GPT está altamente correlacionado, mientras que para la enzima GOT no es tan claro, probablemente debido a que la actividad de la enzima GOT es menos específica de daño hepático y puede estar alterada de partida debido a que los animales están alimentados con dieta grasa pudiendo afectar a la actividad de la enzima.

La contribución relativa de los procesos apoptóticos y necróticos a la lesión hepática tras la IR es muy variable dependiendo del modelo de estudio (Malhi et al, 2006; Schulze-Bergkamen et al, 2006; Smith & Mooney, 2007; Wang et al, 2009). En nuestro estudio hemos valorado como la ausencia de PGC-1 α y la esteatosis hepática impacta en el número de hepatocitos que sufre apoptosis. Inicialmente, comprobamos que, como ya se había descrito previamente, en el hígado graso de manera basal tiene lugar un número importante de procesos apoptóticos. Además, observamos que los procesos de IR y PCI los distintos grupos de ratones aumentan o disminuyen el número de núcleos apoptóticos de manera que está en consonancia con la gravedad de las lesiones observadas y con los resultados obtenidos previamente por lo que se puede concluir que la apoptosis juega un papel relevante al menos en nuestro modelo de estudio.

La aparición de núcleos apoptóticos en el hígado graso ya en situación basal esta ampliamente descrita (Ferreira et al, 2011; Suzuki et al, 2011) y puede relacionarse con la lipotoxicidad mitocondrial, que consiste en una disfunción mitocondrial asociada de forma directa al metabolismo lipídico aberrante debida a la acumulación patológica de ácidos grasos libres en el citosol del hepatocito. El hecho de que los ratones PGC-1 α ^{-/-} no presenten este tipo de lesiones basales, podría explicarse por la ausencia de acumulación lipídica en el hígado de estos ratones, sugiriendo que la apoptosis observada en condiciones basales en el hígado graso no es el resultado de bajos niveles de actividad de PGC-1 α si no de la acumulación patológica de ácidos grasos libres en el hepatocito.

Se han realizado varios estudios encaminados a intentar mejorar la respuesta del hígado graso al trasplante con diferentes protocolos de PCI (Serafin et al, 2002; Rolo et al, 2009; von Heesen et al, 2011). Tanto nuestro estudio, como el de otros autores indican por el contrario que el PCI en hígado graso, en lugar de ser beneficioso es de hecho perjudicial, porque el hígado acumula más daño ante la incapacidad de inducir

mecanismos de protección. En esta línea, terapias alternativas, como sería la propia activación de PGC-1 α en el hígado del donante podría probablemente ser más efectiva en la reversión del fenotipo.

Los hígados grasos y los hígados de los ratones PGC-1 α ^{-/-} que se analizaron una semana después de realizar el protocolo de IR y de PCI muestran cambios dramáticos en la estructura hepática, que incluyen la desaparición de la característica estructura vacuolizada del hígado graso. Los cambios observados son similares a los de otros estudios realizados con hígados graso (Serviddio et al, 2008) y coherentes con el desencadenamiento de procesos fibróticos, que puede ser indicativo de un proceso patogénico, pero no hemos demostrado formalmente que esto sea así.

En relación con este hecho, cabe reseñar que los pacientes con hígado graso tienen altas tasas de desarrollo de esteatohepatitis que puede evolucionar a cirrosis. Sería interesante evaluar si los ratones PGC-1 α ^{-/-} tienen mayor tendencia que los ratones normales a desarrollar esteatohepatitis y cirrosis, dado que estudios recientes apoyan la hipótesis de que la situación de estrés oxidativo, que sufren estos hígados es un desencadenante esencial en la evolución patológica hacia la cirrosis que tiene los pacientes con hígado graso (Serviddio et al, 2008).

Podemos por tanto, concluir que, los resultados presentados muestran que la acción reguladora de PGC-1 α sobre un grupo de genes implicados en procesos de detoxificación de ROS parece fundamental para proteger al hígado del daño por IR, sugiriendo que PGC-1 α es un mediador clave del PCI (Fig. 39). Es además, posible especular con la idea de que PGC-1 α tenga otros efectos protectores no directamente relacionados con los ROS y que faciliten la supervivencia del hepatocito, cabe destacar en este sentido la inducción de VEGF que es necesaria para la revascularización del tejido, debido a que la propia IR daña de forma importante la microvasculatura en dicho proceso y la inducción de VEGF sería necesaria para la formación de nuevos vasos tras la lesión (Amini et al, 2011; Crivellato, 2011),.

A la vista de los resultados obtenidos este trabajo permite proponer a PGC-1 α como diana terapéutica cuya activación podría mejorar la respuesta del hígado graso al trasplante hepático. La sobreexpresión de PGC-1 α en el hígado cabe esperar que promueva la activación de los sistema de detoxificación de ROS mitocondriales, previniendo la disfunción mitocondrial y la muerte del hepatocito.

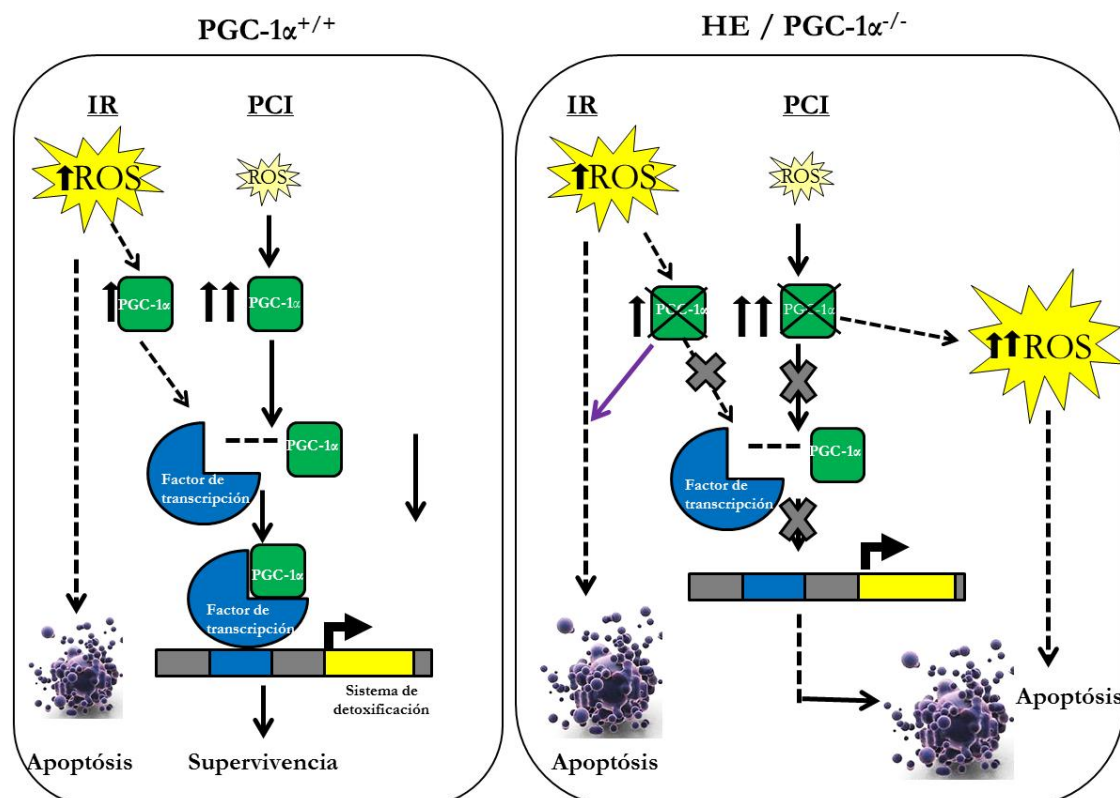


Figura. 39. Modelo de la implicación de PGC-1 α en la protección frente a la lesión por IR. En presencia de PGC-1 α , durante en PCI se produce la activación del sistema de detoxificación de ROS, debido a que las pequeñas cantidades de ROS generadas durante el PCI hacen que se active PGC-1 α promoviendo la activación del sistema de detoxificación mitocondrial, que protege al tejido frente a la lesión posterior. Sin embargo, en ausencia o disminución de la expresión de PGC-1 α , el sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial no se induce debido a la ausencia de PGC-1 α , generando más daño en el tejido y promoviendo la activación de rutas apoptóticas o necróticas en la célula.

Con el fin de esclarecer los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de PGC-1 α en respuesta a la hipoxia/reoxigenación, se aislaron hepatocitos primarios en los que se comenzó por valorar los cambios de expresión de PGC-1 α en respuesta a cambios en la tensión de O₂. En este sentido nos encontramos con un resultado sorprendente, dado que está descrito que PGC-1 α se induce por hipoxia 1 α (Storey, 2003; Arany et al, 2008; Gutsaeva et al, 2008; Zhu et al, 2010). Se observó que aunque es cierto que cuando los hepatocitos pasan de una tensión de 20% de O₂ a una tensión del 1% de O₂ se produce un incremento en los niveles de PGC-1 α , coherente con los resultados publicados, sin embargo, el cambio de un 3% a un 1% de O₂, que reproduce mucho mejor las tensiones de O₂ a las que se expone el hepatocito *in vivo*, no supone un aumento, sino que por el contrario supone una reducción en los niveles de PGC-1 α , tanto en condiciones de medio rico en factores de crecimiento como en ausencia de ellos. Por tanto se podría especular con la idea de que la discrepancia de los resultados con lo publicado a esta hora, podría deberse a que se utilizaron distintas concentraciones de oxígeno de partida, además, como ya se ha comentado

previamente, no se ha observado el incremento de los niveles de PGC-1 α en el cambio de un 3% a un 1% de O₂ en experimentos realizados a distintos tiempos.

El cambio del 1% al 3% de O₂ si que reproduce una subida en los niveles de PGC-1 α , detectable a nivel de ARNm y de proteína. Este resultado sugiere que es más probable que la inducción de PGC-1 α se produzca durante la fase de reperfusión *in vivo* que durante la fase de hipoxia, además el empleo de antioxidantes durante la fase de reoxigenación evita la recuperación de los niveles de PGC-1 α , sugiriendo que el aumento de ROS generados durante la fase de reperfusión serían necesarios para inducir su expresión, aunque para validar esta idea serían necesarios nuevos experimentos *in vivo*.

La hipoxia favorece el aumento del Ca²⁺ citosólico. La activación por Ca²⁺ de la Cn es fundamental tanto en la activación los procesos apoptóticos como de los inflamatorios inducidos por la propia IR en el hígado y por el rechazo inmunitario del órgano transplantado (Yang et al, 2006; Vila-Petroff et al, 2007; Salas et al, 2010). Por ello la ciclosporina (CsA), un inhibidor farmacológico de la Cn se utiliza como tratamiento de base en pacientes transplantados (Fung et al, 2005) Por ello y teniendo en cuenta que se ha descrito que el Ca²⁺ regula positivamente la expresión de PGC-1 α por mecanismos dependientes e independientes de Cn, decidimos analizar la contribución de esta regulación a la respuesta de PGC-1 α a los cambios de tensión de oxígeno *in vitro*. Los resultados obtenidos indican que al menos *in vitro*, la CsA previene la disminución en los niveles de PGC-1 α durante la hipoxia, lo que sugiere que en este modelo, la Cn inhibe la expresión de PGC-1 α . El mecanismo por el cual ocurre esta supresión no está aún esclarecido, pero podría deberse a la represión del promotor de PGC-1 α por NFAT, un factor de transcripción activado por la Cn, dado que ensayos de expresión transitoria llevados a cabo en el laboratorio de la Dra. Eva Cano muestran que una forma constitutivamente activa de NFAT suprime la expresión de un fragmento de 2 Kpb del promotor de PGC-1 α .

La hipótesis de que los cambios observados en diversos sistemas antioxidantes en respuesta a cambios en tensión de O₂ están mediados por la regulación de PGC-1 α se han validado en los estudios *in vitro*, en los cuales se observa que en los hepatocitos PGC-1 α ^{-/-} tras una fase de hipoxia, no son capaces tras la reoxigenación, de recuperar la expresión de los sistemas antioxidantes y la disminución de la expresión de estos sistemas durante la hipoxia es mayor que en los hepatocitos control.

Estos resultados apoyan por tanto el papel de PGC-1 α como regulador de los sistemas antioxidantes en respuesta a cambios en la tensión de O₂, indicando que es muy probable que la inducción de PGC-1 α observada *in vivo* en respuesta a la IR ocurra en respuesta a la fase de reperfusión y no a la de hipoxia, tal vez inducido por ROS y que la activación por hipoxia de la Cn tiene un papel inhibitorio sobre la expresión de PGC-1 α , posiblemente de forma dependiente de NFAT.

Los resultados presentados en este trabajo proponen que PGC-1 α regula la actividad transcripcional de TLS sobre los genes del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial en hepatocitos primarios de ratón. Al mismo tiempo, sugieren que la protección observada durante el preconditionamiento isquémico se produce al menos en parte, debido a la regulación que ejerce PGC-1 α sobre los genes del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial, controlando la acumulación de ROS generados durante la lesión. Por último, apuntan que, la regulación en el proceso de isquemia-reoxigenación podría llevarse a cabo a través de la ruta de señalización de calcio-calcineurina.

CONCLUSIONES

1. TLS interacciona directamente con PGC-1 α y actúa como un cofactor transcripcional de PGC-1 α .
2. TLS regula la expresión de los genes de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial.
3. TLS coopera con PGC-1 α en la inducción de la expresión de los genes antioxidantes.
4. TLS y PGC-1 α se requieren mutuamente para inducir la expresión de los genes antioxidantes.
5. La actividad transcripcional de TLS es muy dependiente del coactivador transcripcional PGC-1 α . Esta dependencia es particularmente notable en el caso de los genes regulados positivamente por TLS.
6. En el hígado, la actividad de PGC-1 α sobre la inducción de los sistemas antioxidantes media en el preconditionamiento isquémico.
7. La expresión y actividad de PGC-1 α se regula positivamente en respuesta a la isquemia-reperfusión en ratones con el hígado normal pero no en ratones con el hígado graso. La inducción de los sistemas antioxidantes que se produce normalmente en respuesta a la isquemia-reperfusión, no ocurre ni en los hígados deficientes en PGC-1 α , ni en los hígados grasos, en los que la actividad de PGC-1 α está reducida.
8. El daño hepático en respuesta a la isquemia-reperfusión es mayor en los hígados deficientes en PGC-1 α y en los hígados grasos, en los que la actividad de PGC-1 α está reducida, que en los hígados normales.
9. Los hígados de los ratones en los que PGC-1 α no está presente y los hígados grasos, en los que la actividad de PGC-1 α está reducida, no responden al preconditionamiento isquémico.
10. La activación por Ca²⁺ de la Calcineurina, que ocurre en respuesta a la hipoxia en los hepatocitos tiene un efecto neto inhibitorio sobre la expresión de PGC-1 α .

BIBLIOGRAFÍA

- Adamson GM, Billings RE (1992) Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* **294**(1): 223-229
- Aharoni-Simon M, Hann-Obercyger M, Pen S, Madar Z, Tirosh O (2011) Fatty liver is associated with impaired activity of PPARgamma-coactivator 1alpha (PGC1alpha) and mitochondrial biogenesis in mice. *Lab Invest* **91**(7): 1018-1028
- Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, Burt AD, Day CP (2005) Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* **54**(7): 987-993
- Albers E, Larsson C, Andlid T, Walsh MC, Gustafsson L (2007) Effect of nutrient starvation on the cellular composition and metabolic capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **73**(15): 4839-4848
- Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J (2007) Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* **100**(10): 1512-1521
- Alchera E, Dal Ponte C, Imarisio C, Albano E, Carini R (2010) Molecular mechanisms of liver preconditioning. *World J Gastroenterol* **16**(48): 6058-6067
- Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R (2008) Adenosine-dependent activation of hypoxia-inducible factor-1 induces late preconditioning in liver cells. *Hepatology* **48**(1): 230-239
- Alliegro MC, Alliegro MA (1996) A nuclear protein regulated during the transition from active to quiescent phenotype in cultured endothelial cells. *Dev Biol* **174**(2): 288-297
- Amini A, Moghaddam SM, Morris DL, Pourgholami MH (2011) The Critical Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Tumor Angiogenesis. *Curr Cancer Drug Targets*
- Andersson MK, Stahlberg A, Arvidsson Y, Olofsson A, Semb H, Stenman G, Nilsson O, Aman P (2008) The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol* **9**: 37
- Andersson U, Scarpulla RC (2001) Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **21**(11): 3738-3749
- Antonescu CR, Tschernyavsky SJ, Decuseara R, Leung DH, Woodruff JM, Brennan MF, Bridge JA, Neff JR, Goldblum JR, Ladanyi M (2001) Prognostic impact of P53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: a molecular and clinicopathologic study of 82 cases. *Clin Cancer Res* **7**(12): 3977-3987
- Aoi W, Naito Y, Mizushima K, Takanami Y, Kawai Y, Ichikawa H, Yoshikawa T (2010) The microRNA miR-696 regulates PGC-1{alpha} in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**(4): E799-806
- Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH, Rosenzweig A, Spiegelman BM (2008) HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature* **451**(7181): 1008-1012
- Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu PH, Rybkin II, Shelton JM, Manieri M, Cinti S, Schoen FJ, Bassel-Duby R, Rosenzweig A, Ingwall JS, Spiegelman BM (2005) Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* **1**(4): 259-271

- Ardite E, Ramos C, Rimola A, Grande L, Fernandez-Checa JC (1999) Hepatocellular oxidative stress and initial graft injury in human liver transplantation. *J Hepatol* **31**(5): 921-927
- Azevedo A, Santos A, Ribeiro L, azevedo I, Soares R, Costa C (2009) the metabolic síndrome in oxidative stress, inflammation and angiogenesis in the metaboic síndrome. *Springer Science*: 1-19
- Baar K, Song Z, Semenkovich CF, Jones TE, Han DH, Nolte LA, Ojuka EO, Chen M, Holloszy JO (2003) Skeletal muscle overexpression of nuclear respiratory factor 1 increases glucose transport capacity. *FASEB J* **17**(12): 1666-1673
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO (2002) Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* **16**(14): 1879-1886
- Babior BM (1995) The respiratory burst oxidase. *Curr Opin Hematol* **2**(1): 55-60
- Bae BI, Xu H, Igarashi S, Fujimuro M, Agrawal N, Taya Y, Hayward SD, Moran TH, Montell C, Ross CA, Snyder SH, Sawa A (2005) p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* **47**(1): 29-41
- Baechtold H, Kuroda M, Sok J, Ron D, Lopez BS, Akhmedov AT (1999) Human 75-kDa DNA-pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation. *J Biol Chem* **274**(48): 34337-34342
- Bahjat FR, Dharnidharka VR, Fukuzuka K, Morel L, Crawford JM, Clare-Salzler MJ, Moldawer LL (2000) Reduced susceptibility of nonobese diabetic mice to TNF-alpha and D-galactosamine-mediated hepatocellular apoptosis and lethality. *J Immunol* **165**(11): 6559-6567
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**(4): 483-495
- Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, Burow DL, Conklin CA, Hu Z, Reuf J, Horaist C, Lebovitz R, Hunter GC, McIntyre K, Runge MS (2002) Mitochondrial integrity and function in atherosclerosis. *Circulation* **106**(5): 544-549
- Banmeyer I, Marchand C, Clippe A, Knoop B (2005) Human mitochondrial peroxiredoxin 5 protects from mitochondrial DNA damages induced by hydrogen peroxide. *FEBS Lett* **579**(11): 2327-2333
- Banmeyer I, Marchand C, Verhaeghe C, Vucic B, Rees JF, Knoop B (2004) Overexpression of human peroxiredoxin 5 in subcellular compartments of Chinese hamster ovary cells: effects on cytotoxicity and DNA damage caused by peroxides. *Free Radic Biol Med* **36**(1): 65-77
- Banzet S, Koulmann N, Simler N, Sanchez H, Chapot R, Serrurier B, Peinnequin A, Bigard X (2009) Control of gluconeogenic genes during intense/prolonged exercise: hormone-independent effect of muscle-derived IL-6 on hepatic tissue and PEPCK mRNA. *J Appl Physiol* **107**(6): 1830-1839
- Barroso E, Rodriguez-Calvo R, Serrano-Marco L, Astudillo AM, Balsinde J, Palomer X, Vazquez-Carrera M (2011) The PPARbeta/delta activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1alpha-Lipin 1-PPARalpha pathway leading to increased fatty acid oxidation. *Endocrinology* **152**(5): 1848-1859
- Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW, 3rd, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B (2000) Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* **287**(5454): 848-851

- Bertolotti A, Bell B, Tora L (1999) The N-terminal domain of human TAFII68 displays transactivation and oncogenic properties. *Oncogene* **18**(56): 8000-8010
- Bertrand P, Akhmedov AT, Delacote F, Durrbach A, Lopez BS (1999) Human POMp75 is identified as the pro-oncoprotein TLS/FUS: both POMp75 and POMp100 DNA homologous pairing activities are associated to cell proliferation. *Oncogene* **18**(31): 4515-4521
- Bienengraeber M, Ozcan C, Terzic A (2003) Stable transfection of UCP1 confers resistance to hypoxia/reoxygenation in a heart-derived cell line. *J Mol Cell Cardiol* **35**(7): 861-865
- Biermann J, Lagreze WA, Schallner N, Schwer CI, Goebel U (2011) Inhalative preconditioning with hydrogen sulfide attenuated apoptosis after retinal ischemia/reperfusion injury. *Mol Vis* **17**: 1275-1286
- Birket MJ, Passos JF, von Zglinicki T, Birch-Machin MA (2009) The relationship between the aging- and photo-dependent T414G mitochondrial DNA mutation with cellular senescence and reactive oxygen species production in cultured skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* **129**(6): 1361-1366
- Blair IP, Williams KL, Warraich ST, Durnall JC, Thoeng AD, Manavis J, Blumbergs PC, Vucic S, Kiernan MC, Nicholson GA (2009) FUS mutations in amyotrophic lateral sclerosis: clinical, pathological, neurophysiological and genetic analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **81**(6): 639-645
- Blattner FR, Schroeder JL (1984) A computer package for DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Res* **12**(1 Pt 2): 615-617
- Bohr VA (2002) Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* **32**(9): 804-812
- Boirie Y (2003) Insulin regulation of mitochondrial proteins and oxidative phosphorylation in human muscle. *Trends Endocrinol Metab* **14**(9): 393-394
- Bolli R (2000) The late phase of preconditioning. *Circ Res* **87**(11): 972-983
- Bonawitz ND, Rodeheffer MS, Shadel GS (2006) Defective mitochondrial gene expression results in reactive oxygen species-mediated inhibition of respiration and reduction of yeast life span. *Mol Cell Biol* **26**(13): 4818-4829
- Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M (2006) Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *FASEB J* **20**(11): 1889-1891
- Bouvet P, Diaz JJ, Kindbeiter K, Madjar JJ, Amalric F (1998) Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J Biol Chem* **273**(30): 19025-19029
- Boveris A, Oshino N, Chance B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* **128**(3): 617-630
- Boyd-Kimball D, Sultana R, Abdul HM, Butterfield DA (2005) Gamma-glutamylcysteine ethyl ester-induced up-regulation of glutathione protects neurons against Abeta(1-42)-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **79**(5): 700-706
- Brooke GN, Culley RL, Dart DA, Mann DJ, Gaughan L, McCracken SR, Robson CN, Spencer-Dene B, Gamble SC, Powell SM, Wait R, Waxman J, Walker MM, Bevan CL (2011) FUS/TLS is a novel mediator of androgen-dependent cell-cycle progression and prostate cancer growth. *Cancer Res* **71**(3): 914-924
- Brown GC, Borutaite V (2001) Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* **52**(3-5): 189-195

- Brownlee M (2003) A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *J Clin Invest* **112**(12): 1788-1790
- Burd CG, Dreyfuss G (1994) RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *Embo J* **13**(5): 1197-1204
- Burhans WC, Heintz NH (2009) The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med* **47**(9): 1282-1293
- Burkart EM, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Gierasch CM, Shoghi K, Welch MJ, Kelly DP (2007) Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J Clin Invest* **117**(12): 3930-3939
- Buroker NE, Ning XH, Portman M (2008) Cardiac PPARalpha Protein Expression is Constant as Alternate Nuclear Receptors and PGC-1 Coordinately Increase During the Postnatal Metabolic Transition. *PPAR Res* **2008**: 279531
- Busuttil RW, Tanaka K (2003) The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl* **9**(7): 651-663
- Cadenas E (2004) Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med* **25**(1-2): 17-26
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **180**(2): 248-257
- Cai ZP, Shen Z, Van Kaer L, Becker LC (2008) Ischemic preconditioning-induced cardioprotection is lost in mice with immunoproteasome subunit low molecular mass polypeptide-2 deficiency. *FASEB J* **22**(12): 4248-4257
- Canto C, Auwerx J (2009) PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* **20**(2): 98-105
- Canto C, Auwerx J (2010) AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci* **67**(20): 3407-3423
- Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, Floering LM, Spiegelman BM, Collins S (2004) p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol* **24**(7): 3057-3067
- Caraceni P, Ryu HS, van Thiel DH, Borle AB (1995) Source of oxygen free radicals produced by rat hepatocytes during postanoxic reoxygenation. *Biochim Biophys Acta* **1268**(3): 249-254
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, Paola D, Pronzato MA, Albano E (2001) Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* **33**(1): 131-139
- Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Baldanzi G, Nitti MP, Alchera E, Filigheddu N, Domenicotti C, Pronzato MA, Graziani A, Albano E (2004) Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the development of hepatocyte preconditioning. *Gastroenterology* **127**(3): 914-923
- Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Domenicotti C, Nitti MP, Pronzato MA, Albano E (2003) Signal pathway responsible for hepatocyte preconditioning by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* **34**(8): 1047-1055

- Carini R, Trinchieri NF, Alchera E, De Cesaris MG, Castino R, Splendore R, Albano E, Isidoro C (2006) PI3K-dependent lysosome exocytosis in nitric oxide-preconditioned hepatocytes. *Free Radic Biol Med* **40**(10): 1738-1748
- Carraway MS, Suliman HB, Jones WS, Chen CW, Babiker A, Piantadosi CA (2010) Erythropoietin activates mitochondrial biogenesis and couples red cell mass to mitochondrial mass in the heart. *Circ Res* **106**(11): 1722-1730
- Cartegni L, Maconi M, Morandi E, Cobiauchi F, Riva S, Biamonti G (1996) hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins. *J Mol Biol* **259**(3): 337-348
- Carvalho C, Correia SC, Santos RX, Cardoso S, Moreira PI, Clark TA, Zhu X, Smith MA, Perry G (2009) Role of mitochondrial-mediated signaling pathways in Alzheimer disease and hypoxia. *J Bioenerg Biomembr* **41**(5): 433-440
- Carvalho GM, Carvalho AP, Folescu TW, Higa L, Teixeira LM, Plotkowski MC, Merquior VL, Albano RM, Marques EA (2005) Transient isolation of Burkholderia multivorans and Burkholderia cenocepacia from a Brazilian cystic fibrosis patient chronically colonized with Burkholderia vietnamiensis. *J Cyst Fibros* **4**(4): 267-270
- Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, Smith SR, Ravussin E (2007) Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med* **4**(3): e76
- Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC (2000) Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* **232**(2): 155-162
- Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC (1974) The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(7): 2777-2781
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* **305**(5682): 390-392
- Cohen MV, Baines CP, Downey JM (2000) Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annu Rev Physiol* **62**: 79-109
- Conley KE, Marcinek DJ, Villarin J (2007) Mitochondrial dysfunction and age. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10**(6): 688-692
- Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG (1992) Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat--an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation* **54**(2): 199-204
- Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, Schmahl W, Chien KR, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M (2004) Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol* **24**(21): 9414-9423
- Conti B, Sugama S, Lucero J, Winsky-Sommerer R, Wirz SA, Maher P, Andrews Z, Barr AM, Morale MC, Paneda C, Pemberton J, Gaidarova S, Behrens MM, Beal F, Sanna PP, Horvath T, Bartfai T (2005) Uncoupling protein 2 protects dopaminergic neurons from acute 1,2,3,6-methyl-phenyl-tetrahydropyridine toxicity. *J Neurochem* **93**(2): 493-501

- Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB (2010) Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem J* **425**(2): 313-325
- Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY (1992) Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(21): 10405-10409
- Crivellato E (2011) The role of angiogenic growth factors in organogenesis. *Int J Dev Biol* **55**(4-5): 365-375
- Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA (1999) Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat Res* **434**(3): 137-148
- Crozat A, Aman P, Mandahl N, Ron D (1993) Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* **363**(6430): 640-644
- Czubryt MP, McAnally J, Fishman GI, Olson EN (2003) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1711-1716
- Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW (2003) Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **37**(3): 544-550
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**(3): 527-605
- Chang JS, Huypens P, Zhang Y, Black C, Kralli A, Gettys TW (2010) Regulation of NT-PGC-1alpha subcellular localization and function by protein kinase A-dependent modulation of nuclear export by CRM1. *J Biol Chem* **285**(23): 18039-18050
- Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, Rhee SG (2004) Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J Biol Chem* **279**(40): 41975-41984
- Chatterjee A, Dasgupta S, Sidransky D (2011) Mitochondrial subversion in cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**(5): 638-654
- Chen L, Na R, Gu M, Salmon AB, Liu Y, Liang H, Qi W, Van Remmen H, Richardson A, Ran Q (2008) Reduction of mitochondrial H₂O₂ by overexpressing peroxiredoxin 3 improves glucose tolerance in mice. *Aging Cell* **7**(6): 866-878
- Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ (2006a) Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* **319**(3): 1405-1412
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* **278**(38): 36027-36031
- Chen W, Qiu JF, Zhang ZQ, Luo HF, Rosello-Catafau J, Wu ZY (2006b) Gene expression changes after hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **5**(3): 416-421
- Chen Z, Peng IC, Cui X, Li YS, Chien S, Shyy JY (2010) Shear stress, SIRT1, and vascular homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(22): 10268-10273
- Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, Wang X, Chun B, Zhuang J, Zhang C (2010) Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovasc Res* **87**(3): 431-439

- Chio A, Restagno G, Brunetti M, Ossola I, Calvo A, Mora G, Sabatelli M, Monsurro MR, Battistini S, Mandrioli J, Salvi F, Spataro R, Schymick J, Traynor BJ, La Bella V (2009) Two Italian kindreds with familial amyotrophic lateral sclerosis due to FUS mutation. *Neurobiol Aging* **30**(8): 1272-1275
- Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Tome ME, Ranger-Moore J, Cordova CA, Mikhael DM, Briehl MM, Alberts DS (2007) Modulation of human glutathione s-transferases by polyphenon e intervention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**(8): 1662-1666
- Davies KJ (1999) The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life* **48**(1): 41-47
- De Simoni S, Goemaere J, Knoop B (2008) Silencing of peroxiredoxin 3 and peroxiredoxin 5 reveals the role of mitochondrial peroxiredoxins in the protection of human neuroblastoma SH-SY5Y cells toward MPP+. *Neurosci Lett* **433**(3): 219-224
- Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD, Lauterio TJ, Prewitt RL (2001) Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension* **37**(2 Part 2): 554-560
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ (2005) Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* **115**(5): 1343-1351
- Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, Than ME, Mackenzie IR, Capell A, Schmid B, Neumann M, Haass C (2010) ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J* **29**(16): 2841-2857
- Doudican NA, Song B, Shadel GS, Doetsch PW (2005) Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **25**(12): 5196-5204
- Downey JM, Davis AM, Cohen MV (2007) Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev* **12**(3-4): 181-188
- Downey JM, Liu GS, Thornton JD (1993) Adenosine and the anti-infarct effects of preconditioning. *Cardiovasc Res* **27**(1): 3-8
- Duchen MR (2004) Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* **25**(4): 365-451
- Duncan JG, Bharadwaj KG, Fong JL, Mitra R, Sambandam N, Courtois MR, Lavine KJ, Goldberg IJ, Kelly DP (2010) Rescue of cardiomyopathy in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha transgenic mice by deletion of lipoprotein lipase identifies sources of cardiac lipids and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *Circulation* **121**(3): 426-435
- Duval C, Negre-Salvayre A, Dogilo A, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L (2002) Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. *Biochem Cell Biol* **80**(6): 757-764
- Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**(6867): 96-99
- Elahi MM, Kong YX, Matata BM (2009) Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev* **2**(5): 259-269

- Elahi MM, Matata BM (2006) Free radicals in blood: evolving concepts in the mechanism of ischemic heart disease. *Arch Biochem Biophys* **450**(1): 78-88
- Elahi MM, Naseem KM, Matata BM (2007) Nitric oxide in blood. The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease. *FEBS J* **274**(4): 906-923
- Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM (2002) Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet* **31**(3): 289-294
- Fedeles BI, Zhu AY, Young KS, Hillier SM, Proffitt KD, Essigmann JM, Croy RG (2011) Chemical genetics analysis of an aniline mustard anticancer agent reveals complex I of the electron transport chain as a target. *J Biol Chem*
- Feldstein AE, Bailey SM (2011) Emerging role of redox dysregulation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Antioxid Redox Signal* **15**(2): 421-424
- Ferreira DM, Castro RE, Machado MV, Evangelista T, Silvestre A, Costa A, Coutinho J, Carepa F, Cortez-Pinto H, Rodrigues CM (2011) Apoptosis and insulin resistance in liver and peripheral tissues of morbidly obese patients is associated with different stages of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia* **54**(7): 1788-1798
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**(6809): 239-247
- Fisher KW, Das B, Kortum RL, Chaika OV, Lewis RE (2011) Kinase Suppressor of Ras 1 (KSR1) Regulates PGC1{alpha} and Estrogen-Related Receptor {alpha} To Promote Oncogenic Ras-Dependent Anchorage-Independent Growth. *Mol Cell Biol* **31**(12): 2453-2461
- Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M (2008) Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Med Genet* **9**: 30
- Franchello A, Gilbo N, David E, Ricchiuti A, Romagnoli R, Cerutti E, Salizzoni M (2009) Ischemic preconditioning (IP) of the liver as a safe and protective technique against ischemia/reperfusion injury (IRI). *Am J Transplant* **9**(7): 1629-1639
- Fromenty B, Pessayre D (1995) Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* **67**(1): 101-154
- Fu X, Wan S, Lyu YL, Liu LF, Qi H (2008) Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PLoS One* **3**(4): e2009
- Fujii R, Takumi T (2005) TLS facilitates transport of mRNA encoding an actin-stabilizing protein to dendritic spines. *J Cell Sci* **118**(Pt 24): 5755-5765
- Fujimoto H, Taguchi J, Imai Y, Ayabe S, Hashimoto H, Kobayashi H, Ogasawara K, Aizawa T, Yamakado M, Nagai R, Ohno M (2008) Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. *Eur Heart J* **29**(10): 1267-1274
- Fujita T (2008) Aldosterone in salt-sensitive hypertension and metabolic syndrome. *J Mol Med* **86**(6): 729-734
- Fulop P, Derdak Z, Sheets A, Sabo E, Berthiaume EP, Resnick MB, Wands JR, Paragh G, Baffy G (2006) Lack of UCP2 reduces Fas-mediated liver injury in ob/ob mice and reveals importance of cell-specific UCP2 expression. *Hepatology* **44**(3): 592-601

- Funaki H, Shimizu K, Harada S, Tsuyama H, Fushida S, Tani T, Miwa K (2002) Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation* **74**(4): 551-556
- Fung J, Kelly D, Kadry Z, Patel-Tom K, Eghtesad B (2005) Immunosuppression in liver transplantation: beyond calcineurin inhibitors. *Liver Transpl* **11**(3): 267-280
- Gal J, Zhang J, Kwinter DM, Zhai J, Jia H, Jia J, Zhu H (2010) Nuclear localization sequence of FUS and induction of stress granules by ALS mutants. *Neurobiol Aging*
- Ganote CE, Armstrong SC (2003) Effects of CCCP-induced mitochondrial uncoupling and cyclosporin A on cell volume, cell injury and preconditioning protection of isolated rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **35**(7): 749-759
- Gardiner M, Toth R, Vandermoere F, Morrice NA, Rouse J (2008) Identification and characterization of FUS/TLS as a new target of ATM. *Biochem J* **415**(2): 297-307
- Garnier A, Zoll J, Fortin D, N'Guessan B, Lefebvre F, Geny B, Mettauer B, Veksler V, Ventura-Clapier R (2009) Control by circulating factors of mitochondrial function and transcription cascade in heart failure: a role for endothelin-1 and angiotensin II. *Circ Heart Fail* **2**(4): 342-350
- Gasdaska PY, Berggren MM, Berry MJ, Powis G (1999) Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. *FEBS Lett* **442**(1): 105-111
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**(3): 493-501
- Geng T, Li P, Okutsu M, Yin X, Kwek J, Zhang M, Yan Z (2010) PGC-1alpha plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**(3): C572-579
- George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G (2003) Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol* **39**(5): 756-764
- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P (2007) Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J* **26**(7): 1913-1923
- Ghosh HS (2008) The anti-aging, metabolism potential of SIRT1. *Curr Opin Investig Drugs* **9**(10): 1095-1102
- Giacco F, Brownlee M (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* **107**(9): 1058-1070
- Giulivi C, Boveris A, Cadenas E (1995) Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* **316**(2): 909-916
- Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD (2003) Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol* **38**(1): 59-66
- Gonzalo R, Garcia-Arumi E, Llige D, Marti R, Solano A, Montoya J, Arenas J, Andreu AL (2005) Free radicals-mediated damage in trans-mitochondrial cells harboring the T14487C mutation in the ND6 gene of mtDNA. *FEBS Lett* **579**(30): 6909-6913

- Goth L, Rass P, Pay A (2004) Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn* **8**(3): 141-149
- Griendling KK, FitzGerald GA (2003) Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* **108**(16): 1912-1916
- Griffiths EJ, Halestrap AP (1993) Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* **25**(12): 1461-1469
- Grobe AC, Wells SM, Benavidez E, Oishi P, Azakie A, Fineman JR, Black SM (2006) Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**(6): L1069-1077
- Groen EJ, van Es MA, van Vught PW, Spliet WG, van Engelen-Lee J, de Visser M, Wokke JH, Schelhaas HJ, Ophoff RA, Fumoto K, Pasterkamp RJ, Dooijes D, Cuppen E, Veldink JH, van den Berg LH (2010) FUS mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis in the Netherlands. *Arch Neurol* **67**(2): 224-230
- Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA (2005) Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev* **19**(4): 453-461
- Guarente L (2008) Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* **132**(2): 171-176
- Gutsaeva DR, Carraway MS, Suliman HB, Demchenko IT, Shitara H, Yonekawa H, Piantadosi CA (2008) Transient hypoxia stimulates mitochondrial biogenesis in brain subcortex by a neuronal nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J Neurosci* **28**(9): 2015-2024
- Gutteridge JM, Halliwell B (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* **899**: 136-147
- Halestrap AP (2009a) Mitochondria and reperfusion injury of the heart--a holey death but not beyond salvation. *J Bioenerg Biomembr* **41**(2): 113-121
- Halestrap AP (2009b) What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* **46**(6): 821-831
- Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* **61**(3): 372-385
- Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I (2007) The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* **1767**(8): 1007-1031
- Halestrap AP, Pasdois P (2009) The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* **1787**(11): 1402-1415
- Hallier M, Lerga A, Barnache S, Tavitian A, Moreau-Gachelin F (1998) The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem* **273**(9): 4838-4842
- Hammarstedt A, Jansson PA, Wesslau C, Yang X, Smith U (2003) Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* **301**(2): 578-582
- Han YH, Park WH (2009) The effects of N-acetyl cysteine, buthionine sulfoximine, diethyldithiocarbamate or 3-amino-1,2,4-triazole on antimycin A-treated Calu-6 lung cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and glutathione. *Oncol Rep* **22**(2): 385-391

- Handschin C (2009) The biology of PGC-1alpha and its therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci* **30**(6): 322-329
- Handschin C, Lin J, Rhee J, Peyer AK, Chin S, Wu PH, Meyer UA, Spiegelman BM (2005) Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. *Cell* **122**(4): 505-515
- Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM (2003) An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12): 7111-7116
- Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T (2002) A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia* **45**(5): 740-743
- Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* **20**(4): 145-147
- Hart ML, Much C, Gorzolla IC, Schittenhelm J, Kloor D, Stahl GL, Eltzschig HK (2008) Extracellular adenosine production by ecto-5'-nucleotidase protects during murine hepatic ischemic preconditioning. *Gastroenterology* **135**(5): 1739-1750 e1733
- Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, Tatematsu S, Hara Y, Minakuchi H, Washida N, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H (2008) Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochem Biophys Res Commun* **372**(1): 51-56
- Hasegawa T, Malle E, Farhood A, Jaeschke H (2005) Generation of hypochlorite-modified proteins by neutrophils during ischemia-reperfusion injury in rat liver: attenuation by ischemic preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**(4): G760-767
- Hassanein T, Frederick T (2004) Mitochondrial dysfunction in liver disease and organ transplantation. *Mitochondrion* **4**(5-6): 609-620
- Hatanaka N, Kamike W, Shimizu S, Miyata M, Inoue T, Yoshida Y, Tagawa K, Matsuda H (1995) Ca²⁺ release from mitochondria induces cytosolic enzyme leakage in anoxic liver. *J Surg Res* **58**(5): 485-490
- Hegde ML, Hazra TK, Mitra S (2008) Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res* **18**(1): 27-47
- Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* **413**(6852): 179-183
- Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M (1995) Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4666-4670
- Hicks GG, Singh N, Nashabi A, Mai S, Bozek G, Klewes L, Arapovic D, White EK, Koury MJ, Oltz EM, Van Kaer L, Ruley HE (2000) Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nat Genet* **24**(2): 175-179
- Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS (2004) Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem* **279**(31): 32804-32812

- Hoene M, Weigert C (2010) The stress response of the liver to physical exercise. *Exerc Immunol Rev* **16**: 163-183
- Horvath TL, Diano S, Barnstable C (2003) Mitochondrial uncoupling protein 2 in the central nervous system: neuromodulator and neuroprotector. *Biochem Pharmacol* **65**(12): 1917-1921
- Horvathova E, Eckl PM, Bresgen N, Slamenova D (2008) Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of H₂O₂ and DMNQ on freshly isolated rat hepatocytes; protective effects of carboxymethyl chitin-glucan. *Neuro Endocrinol Lett* **29**(5): 644-648
- Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J (1996) Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* **222**(1): 27-32
- Huss JM, Kopp RP, Kelly DP (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem* **277**(43): 40265-40274
- Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguere V, Kelly DP (2004) Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* **24**(20): 9079-9091
- Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, Harris CC (2004) p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res* **64**(7): 2350-2356
- Iimuro Y, Bradford BU, Yamashina S, Rusyn I, Nakagami M, Enomoto N, Kono H, Frey W, Forman D, Brenner D, Thurman RG (2000) The glutathione precursor L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid protects against liver injury due to chronic enteral ethanol exposure in the rat. *Hepatology* **31**(2): 391-398
- Imada K, Leonard WJ (2000) The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* **37**(1-2): 1-11
- Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet PM (1995) Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology* **109**(1): 189-197
- Irrcher I, Ljubcic V, Hood DA (2009) Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**(1): C116-123
- Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J (2008) ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* **320**(5876): 661-664
- Ito D, Seki M, Tsunoda Y, Uchiyama H, Suzuki N (2010) Nuclear transport impairment of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations in FUS/TLS. *Ann Neurol* **69**(1): 152-162
- Jaeschke H (1991) Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* **79**(2): 115-136
- Jaeschke H (2003) Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**(1): G15-26
- Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ (1992) Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol* **52**(4): 377-382

- Jaeschke H, Ho YS, Fisher MA, Lawson JA, Farhood A (1999) Glutathione peroxidase-deficient mice are more susceptible to neutrophil-mediated hepatic parenchymal cell injury during endotoxemia: importance of an intracellular oxidant stress. *Hepatology* **29**(2): 443-450
- Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(29): 12017-12022
- Jang S, Imlay JA (2007) Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *J Biol Chem* **282**(2): 929-937
- Jassem W, Heaton ND (2004) The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int* **66**(2): 514-517
- Jiang Y, Zhang H, Dong LY, Wang D, An W (2008) Increased hepatic UCP2 expression in rats with nonalcoholic steatohepatitis is associated with upregulation of Sp1 binding to its motif within the proximal promoter region. *J Cell Biochem* **105**(1): 277-289
- Karamanlidis G, Nascimben L, Couper GS, Shekar PS, del Monte F, Tian R (2010) Defective DNA replication impairs mitochondrial biogenesis in human failing hearts. *Circ Res* **106**(9): 1541-1548
- Kessova IG, Cederbaum AI (2007) Mitochondrial alterations in livers of Sod1^{-/-} mice fed alcohol. *Free Radic Biol Med* **42**(10): 1470-1480
- Kessova IG, Ho YS, Thung S, Cederbaum AI (2003) Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu, Zn-superoxide dismutase. *Hepatology* **38**(5): 1136-1145
- Kevin LG, Camara AK, Riess ML, Novalija E, Stowe DF (2003) Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(2): H566-574
- Kim HJ, Jee HJ, Yun J (2011) DNA damage induces down-regulation of PEPCK and G6P gene expression through degradation of PGC-1 α . *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **43**(8): 589-594
- Kim J, Jang HS, Park KM (2010) Reactive oxygen species generated by renal ischemia and reperfusion trigger protection against subsequent renal ischemia and reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**(1): F158-166
- Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, Biggs WH, 3rd, Wright CV, White MF, Arden KC, Accili D (2002) The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest* **110**(12): 1839-1847
- Klingenberg M, Ehtay KS, Bienengraeber M, Winkler E, Huang SG (1999) Structure-function relationship in UCP1. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23 Suppl 6**: S24-29
- Knight TR, Jaeschke H (2002) Acetaminophen-induced inhibition of Fas receptor-mediated liver cell apoptosis: mitochondrial dysfunction versus glutathione depletion. *Toxicol Appl Pharmacol* **181**(2): 133-141
- Knudsen AR, Kannerup AS, Gronbaek H, Andersen KJ, Funch-Jensen P, Frystyk J, Flyvbjerg A, Mortensen FV (2011) Effects of ischemic pre- and postconditioning on HIF-1 α , VEGF and TGF- β expression after warm ischemia and reperfusion in the rat liver. *Comp Hepatol* **10**(1): 3
- Kobayashi H, Miura T, Ishida H, Miki T, Tanno M, Yano T, Sato T, Hotta H, Shimamoto K (2008) Limitation of infarct size by erythropoietin is associated with translocation of Akt to the mitochondria after reperfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**(7): 812-819

- Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, Motoyama N (2005) SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* **16**(2): 237-243
- Koeppel TA, Lehmann TG, Thies JC, Gehrcke R, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G, Post S (1996) Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* **61**(9): 1397-1402
- Kong X, Fan H, Liu X, Wang R, Liang J, Gupta N, Chen Y, Fang F, Chang Y (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha enhances antiproliferative activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine in cancer cells through induction of uridine phosphorylase. *Mol Pharmacol* **76**(4): 854-860
- Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M (2004) Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci* **34**(1): 57-62
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(3): 248-261
- Kressler D, Schreiber SN, Knutti D, Kralli A (2002) The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* **277**(16): 13918-13925
- Kropotov A, Gogvadze V, Shupliakov O, Tomilin N, Serikov VB, Tomilin NV, Zhivotovsky B (2006) Peroxiredoxin V is essential for protection against apoptosis in human lung carcinoma cells. *Exp Cell Res* **312**(15): 2806-2815
- Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M, Motoshima H, Taguchi T, Matsumura T, Araki E (2006) Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes* **55**(1): 120-127
- Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK (2008) Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res* **68**(6): 1777-1785
- Kumashiro N, Tamura Y, Uchida T, Ogihara T, Fujitani Y, Hirose T, Mochizuki H, Kawamori R, Watada H (2008) Impact of oxidative stress and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in hepatic insulin resistance. *Diabetes* **57**(8): 2083-2091
- Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, Yagi T, Nakagami M, Takada Y, Morimoto T, Yamaoka Y (1996) Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* **128**(3): 251-258
- Kuroda M, Sok J, Webb L, Baechtold H, Urano F, Yin Y, Chung P, de Rooij DG, Akhmedov A, Ashley T, Ron D (2000) Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(-/-) mice. *Embo J* **19**(3): 453-462
- Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* **368**(Pt 2): 545-553
- Kusuhara K, Madsen K, Jensen L, Hellsten Y, Pilegaard H (2007) Calcium signalling in the regulation of PGC-1alpha, PDK4 and HKII mRNA expression. *Biol Chem* **388**(5): 481-488
- Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T, Valdmanis P, Rouleau GA, Hosler BA, Cortelli P, de Jong PJ, Yoshinaga Y, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yan J, Ticozzi N, Siddique T, McKenna-Yasek D, Sapp PC, Horvitz HR, Landers JE, Brown RH, Jr. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323**(5918): 1205-1208

- Lai L, Leone TC, Zechner C, Schaeffer PJ, Kelly SM, Flanagan DP, Medeiros DM, Kovacs A, Kelly DP (2008) Transcriptional coactivators PGC-1alpha and PGC-1beta control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. *Genes Dev* **22**(14): 1948-1961
- Lambert AJ, Brand MD (2009) Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol Biol* **554**: 165-181
- Larsson NG, Barsh GS, Clayton DA (1997) Structure and chromosomal localization of the mouse mitochondrial transcription factor A gene (Tfam). *Mamm Genome* **8**(2): 139-140
- Law WJ, Cann KL, Hicks GG (2006) TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression. *Brief Funct Genomic Proteomic* **5**(1): 8-14
- Le SB, Hailer MK, Buhrow S, Wang Q, Flatten K, Pediaditakis P, Bible KC, Lewis LD, Sausville EA, Pang YP, Ames MM, Lemasters JJ, Holmuhamedov EL, Kaufmann SH (2007) Inhibition of mitochondrial respiration as a source of adaphostin-induced reactive oxygen species and cytotoxicity. *J Biol Chem* **282**(12): 8860-8872
- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9782-9787
- Lebuffe G, Schumacker PT, Shao ZH, Anderson T, Iwase H, Vanden Hoek TL (2003) ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(1): H299-308
- Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR (2000) CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* **105**(8): 1067-1075
- Lee SR, Kim JR, Kwon KS, Yoon HW, Levine RL, Ginsburg A, Rhee SG (1999) Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J Biol Chem* **274**(8): 4722-4734
- Lee WY, Lee SM (2005) Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock* **24**(4): 370-375
- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* **106**(7): 847-856
- Lehman JJ, Boudina S, Banke NH, Sambandam N, Han X, Young DM, Leone TC, Gross RW, Lewandowski ED, Abel ED, Kelly DP (2008) The transcriptional coactivator PGC-1alpha is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(1): H185-196
- Leick L, Lyngby SS, Wojtaszewski JF, Pilegaard H (2010) PGC-1alpha is required for training-induced prevention of age-associated decline in mitochondrial enzymes in mouse skeletal muscle. *Exp Gerontol* **45**(5): 336-342
- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Holloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF, Kelly DP (2005) PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol* **3**(4): e101

- Lerga A, Hallier M, Delva L, Orvain C, Gallais I, Marie J, Moreau-Gachelin F (2001) Identification of an RNA binding specificity for the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem* **276**(9): 6807-6816
- Lerin C, Rodgers JT, Kalume DE, Kim SH, Pandey A, Puigserver P (2006) GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha. *Cell Metab* **3**(6): 429-438
- Letteron P, Fromenty B, Terris B, Degott C, Pessayre D (1996) Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. *J Hepatol* **24**(2): 200-208
- Li J, Zhou K, Meng X, Wu Q, Li S, Liu Y, Wang J (2008) Increased ROS generation and SOD activity in heteroplasmic tissues of transmitochondrial mice with A3243G mitochondrial DNA mutation. *Genet Mol Res* **7**(4): 1054-1062
- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* **278**(10): 8516-8525
- Li S, Arning E, Liu C, Vitvitsky V, Hernandez C, Banerjee R, Bottiglieri T, Lin JD (2009) Regulation of homocysteine homeostasis through the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(3): E543-548
- Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ (2007) Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature* **447**(7147): 1012-1016
- Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM (2002a) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem* **277**(3): 1645-1648
- Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB, Spiegelman BM (2003) PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem* **278**(33): 30843-30848
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM (2002b) Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**(6899): 797-801
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY, Mootha VK, Jager S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan MX, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Rohas LM, Zavacki AM, Cinti S, Shulman GI, Lowell BB, Krainc D, Spiegelman BM (2004) Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* **119**(1): 121-135
- Ling C, Del Guerra S, Lupi R, Ronn T, Granhall C, Luthman H, Masiello P, Marchetti P, Groop L, Del Prato S (2008) Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia* **51**(4): 615-622
- Liochev SI, Fridovich I (2000) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase. *J Biol Chem* **275**(49): 38482-38485
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* **80**(5): 780-787
- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L (1974) Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* **42**(1): 68-72

- Loschen G, Flohe L, Chance B (1971) Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett* **18**(2): 261-264
- Lustig Y, Ruas JL, Estall JL, Lo JC, Devarakonda S, Laznik D, Choi JH, Ono H, Olsen JV, Spiegelman BM (2011) Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1 α through S6 kinase. *Genes Dev* **25**(12): 1232-1244
- Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S (1993) Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* **25**(6): 3303-3304
- Lluis JM, Buricchi F, Chiarugi P, Morales A, Fernandez-Checa JC (2007) Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- κ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death. *Cancer Res* **67**(15): 7368-7377
- Madesh M, Hajnoczky G (2001) VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J Cell Biol* **155**(6): 1003-1015
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ (2006) Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* **43**(2 Suppl 1): S31-44
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* **312**(5780): 1650-1653
- Matsui N, Satsuki I, Morita Y, Inaizumi K, Kasajima K, Kanoh R, Fukuishi N, Akagi M (2000) Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species activate nuclear factor kappa B during hepatic ischemia in rats. *Jpn J Pharmacol* **84**(3): 363-366
- Matsumoto T, O'Malley K, Efron PA, Burger C, McAuliffe PF, Scumpia PO, Uchida T, Tschoeke SK, Fujita S, Moldawer LL, Hemming AW, Foley DP (2006) Interleukin-6 and STAT3 protect the liver from hepatic ischemia and reperfusion injury during ischemic preconditioning. *Surgery* **140**(5): 793-802
- Matsushima S, Ide T, Yamato M, Matsusaka H, Hattori F, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Hasegawa Y, Kurihara T, Oikawa S, Kinugawa S, Tsutsui H (2006) Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation* **113**(14): 1779-1786
- Matsuyama K, Chiba Y, Ihaya A, Kimura T, Tanigawa N, Muraoka R (1997) Effect of spinal cord preconditioning on paraplegia during cross-clamping of the thoracic aorta. *Ann Thorac Surg* **63**(5): 1315-1320
- Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ (1999) Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* **116**(6): 1413-1419
- Maynard S, de Souza-Pinto NC, Scheibye-Knudsen M, Bohr VA (2010) Mitochondrial base excision repair assays. *Methods* **51**(4): 416-425
- Meissner M, Lopato S, Gotzmann J, Sauermann G, Barta A (2003) Proto-oncoprotein TLS/FUS is associated to the nuclear matrix and complexed with splicing factors PTB, SRm160, and SR proteins. *Exp Cell Res* **283**(2): 184-195
- Melov S, Doctrow SR, Schneider JA, Haberson J, Patel M, Coskun PE, Huffman K, Wallace DC, Malfroy B (2001) Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J Neurosci* **21**(21): 8348-8353

- Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM (2001) Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 3820-3825
- Milakovic T, Johnson GV (2005) Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem* **280**(35): 30773-30782
- Miller AA, Drummond GR, Sobey CG (2006) Novel isoforms of NADPH-oxidase in cerebral vascular control. *Pharmacol Ther* **111**(3): 928-948
- Miura T, Tanno M, Sato T (2010) Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis. *Cardiovasc Res* **88**(1): 7-15
- Mizoe A, Kondo S, Azuma T, Fujioka H, Tanaka K, Hashida M, Kanematsu T (1997) Preventive effects of superoxide dismutase derivatives modified with monosaccharides on reperfusion injury in rat liver transplantation. *J Surg Res* **73**(2): 160-165
- Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, Spiegelman BM (2000) Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell* **6**(2): 307-316
- Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA (2008) Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* **147**(1): 153-159
- Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, Yang W, Altshuler D, Puigserver P, Patterson N, Willy PJ, Schulman IG, Heyman RA, Lander ES, Spiegelman BM (2004) Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6570-6575
- Mor E, Klintmalm GB, Gonwa TA, Solomon H, Holman MJ, Gibbs JF, Watemberg I, Goldstein RM, Husberg BS (1992) The use of marginal donors for liver transplantation. A retrospective study of 365 liver donors. *Transplantation* **53**(2): 383-386
- Morohoshi F, Ootsuka Y, Arai K, Ichikawa H, Mitani S, Munakata N, Ohki M (1998) Genomic structure of the human RBP56/hTAFII68 and FUS/TLS genes. *Gene* **221**(2): 191-198
- Morris LG, Veeriah S, Chan TA (2010) Genetic determinants at the interface of cancer and neurodegenerative disease. *Oncogene* **29**(24): 3453-3464
- Muriel P (2009) Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int*
- Murphy E, Steenbergen C (2008) Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* **88**(2): 581-609
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**(5): 1124-1136
- Mustacich D, Powis G (2000) Thioredoxin reductase. *Biochem J* **346 Pt 1**: 1-8
- Naik E, Dixit VM (2011) Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med* **208**(3): 417-420
- Nakagawa Y, Kuwahara K, Takemura G, Akao M, Kato M, Arai Y, Takano M, Harada M, Murakami M, Nakanishi M, Usami S, Yasuno S, Kinoshita H, Fujiwara M, Ueshima K, Nakao K (2009) p300 plays a critical

role in maintaining cardiac mitochondrial function and cell survival in postnatal hearts. *Circ Res* **105**(8): 746-754

Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, Ishikawa Y, Ozaki N, Shimahara Y, Yamaoka Y (1999) Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* **126**(5): 945-954

Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T (2005) SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 {alpha}. *J Biol Chem* **280**(16): 16456-16460

Neumann M, Rademakers R, Roeber S, Baker M, Kretzschmar HA, Mackenzie IR (2009) A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* **132**(Pt 11): 2922-2931

Nieuwenhuijs VB, De Bruijn MT, Padbury RT, Barritt GJ (2006) Hepatic ischemia-reperfusion injury: roles of Ca²⁺ and other intracellular mediators of impaired bile flow and hepatocyte damage. *Dig Dis Sci* **51**(6): 1087-1102

Nijtmans L, Ugalde C, van den Heuvel L, Smeitink J (2004) Function and dysfunction of the oxidative phosphorylation system. *Mitochondrial Function and Biogenesis* **8**: 149-176

Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, Pisconti A, Brunelli S, Cardile A, Francolini M, Cantoni O, Carruba MO, Moncada S, Clementi E (2004) Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16507-16512

Nonn L, Berggren M, Powis G (2003) Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis. *Mol Cancer Res* **1**(9): 682-689

Oberley LW (2005) Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother* **59**(4): 143-148

Olmos Y, Valle I, Borniquel S, Tierrez A, Soria E, Lamas S, Monsalve M (2009) Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1alpha in the induction of oxidative stress genes. *J Biol Chem* **284**(21): 14476-14484

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**(5): 913-922

Oury TD, Crapo JD, Valnickova Z, Enghild JJ (1996) Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochem J* **317** (Pt 1): 51-57

Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C (2006) Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* **58**(1): 87-114

Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR (1995) Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* **29**(6): 782-788

Panowski SH, Dillin A (2009) Signals of youth: endocrine regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Endocrinol Metab* **20**(6): 259-264

Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM (2009) Role of cardiolipin peroxidation and Ca²⁺ in mitochondrial dysfunction and disease. *Cell Calcium* **45**(6): 643-650

- Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S (2005) Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch Surg* **140**(4): 405-409; discussion 410
- Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ (2003) Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8466-8471
- Peralta C, Bulbena O, Bargallo R, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J (2000) Strategies to modulate the deleterious effects of endothelin in hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* **70**(12): 1761-1770
- Peralta C, Bulbena O, Xaus C, Prats N, Cutrin JC, Poli G, Gelpi E, Rosello-Catafau J (2002) Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* **73**(8): 1203-1211
- Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J (1996) Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* **229**(1): 264-270
- Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J (1997) Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* **25**(4): 934-937
- Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J (1999) The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* **29**(1): 126-132
- Perrotti D, Bonatti S, Trotta R, Martinez R, Skorski T, Salomoni P, Grassilli E, Lozzo RV, Cooper DR, Calabretta B (1998) TLS/FUS, a pro-oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Embo J* **17**(15): 4442-4455
- Pessayre D (2007) Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* **22 Suppl 1**: S20-27
- Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A (2001) Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* **21**(1): 57-69
- Pessayre D, Fromenty B (2005) NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol* **42**(6): 928-940
- Piatkiewicz P, Czech A (2011) Glucose metabolism disorders and the risk of cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **59**(3): 215-230
- Pitkanen S, Robinson BH (1996) Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest* **98**(2): 345-351
- Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, Sasaki T, Sollinger HW, Belzer FO, Kalayoglu M (1993) Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation* **55**(4): 807-813
- Portilla D, Dai G, McClure T, Bates L, Kurten R, Megyesi J, Price P, Li S (2002) Alterations of PPARalpha and its coactivator PGC-1 in cisplatin-induced acute renal failure. *Kidney Int* **62**(4): 1208-1218
- Powers CA, Mathur M, Raaka BM, Ron D, Samuels HH (1998) TLS (translocated-in-liposarcoma) is a high-affinity interactor for steroid, thyroid hormone, and retinoid receptors. *Mol Endocrinol* **12**(1): 4-18

- Powers SK, Lennon SL (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* **58**(4): 1025-1033
- Powner DJ (2004) Factors during donor care that may affect liver transplantation outcome. *Prog Transplant* **14**(3): 241-247; quiz 248-249
- Pramanik KC, Boreddy SR, Srivastava SK (2011) Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. *PLoS One* **6**(5): e20151
- Prasad DD, Ouchida M, Lee L, Rao VN, Reddy ES (1994) TLS/FUS fusion domain of TLS/FUS-erg chimeric protein resulting from the t(16;21) chromosomal translocation in human myeloid leukemia functions as a transcriptional activation domain. *Oncogene* **9**(12): 3717-3729
- Pratschke S, Angele MK, Grutzner U, Tufman A, Bilzer M, Loehe F, Jauch KW, Schauer RJ (2010) GSH attenuates organ injury and improves function after transplantation of fatty livers. *Eur Surg Res* **45**(1): 13-19
- Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, Baumgart J, Schroter F, Ninnemann O, Siegert E, Bendix I, Brustle O, Nitsch R, Zipp F, Aktas O (2008) Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol* **10**(4): 385-394
- Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM (1999) Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* **286**(5443): 1368-1371
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**(6939): 550-555
- Puigserver P, Spiegelman BM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* **24**(1): 78-90
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**(6): 829-839
- Qu A, Jiang C, Xu M, Zhang Y, Zhu Y, Xu Q, Zhang C, Wang X (2009) PGC-1alpha attenuates neointimal formation via inhibition of vascular smooth muscle cell migration in the injured rat carotid artery. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**(3): C645-653
- Rabbitts TH, Forster A, Larson R, Nathan P (1993) Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nat Genet* **4**(2): 175-180
- Rana B, Mischoulon D, Xie Y, Bucher NL, Farmer SR (1994) Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. *Mol Cell Biol* **14**(9): 5858-5869
- Rangwala SM, Li X, Lindsley L, Wang X, Shaughnessy S, Daniels TG, Szustakowski J, Nirmala NR, Wu Z, Stevenson SC (2007) Estrogen-related receptor alpha is essential for the expression of antioxidant protection genes and mitochondrial function. *Biochem Biophys Res Commun* **357**(1): 231-236
- Rasbach KA, Schnellmann RG (2007) Signaling of mitochondrial biogenesis following oxidant injury. *J Biol Chem* **282**(4): 2355-2362
- Redaelli CA, Tien YH, Kubulus D, Mazzucchelli L, Schilling MK, Wagner AC (2002) Hyperthermia preconditioning induces renal heat shock protein expression, improves cold ischemia tolerance, kidney graft function and survival in rats. *Nephron* **90**(4): 489-497

- Rey S, Semenza GL (2010) Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res* **86**(2): 236-242
- Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2003) Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 4012-4017
- Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N, Feelisch M, Fukuto J, Wink DA (2004) The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* **385**(1): 1-10
- Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND (2006) Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* **55**(7): 928-934
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* **434**(7029): 113-118
- Rodgers JT, Puigserver P (2007) Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(31): 12861-12866
- Rohas LM, St-Pierre J, Uldry M, Jager S, Handschin C, Spiegelman BM (2007) A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(19): 7933-7938
- Rolo AP, Teodoro JS, Peralta C, Rosello-Catafau J, Palmeira CM (2009) Prevention of IR injury in fatty livers by ischemic preconditioning is associated with increased mitochondrial tolerance: the key role of ATPsynthase and mitochondrial permeability transition. *Transpl Int* **22**(11): 1081-1090
- Rudiger HA, Graf R, Clavien PA (2003) Sub-lethal oxidative stress triggers the protective effects of ischemic preconditioning in the mouse liver. *J Hepatol* **39**(6): 972-977
- Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE, Medeiros DM, Valencik ML, McDonald JA, Kelly DP (2004) Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res* **94**(4): 525-533
- Sahin E, Colla S, Liesa M, Moslehi J, Muller FL, Guo M, Cooper M, Kotton D, Fabian AJ, Walkey C, Maser RS, Tonon G, Foerster F, Xiong R, Wang YA, Shukla SA, Jaskelioff M, Martin ES, Heffernan TP, Protopopov A, Ivanova E, Mahoney JE, Kost-Alimova M, Perry SR, Bronson R, Liao R, Mulligan R, Shrihail OS, Chin L, Depinho RA (2011) Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*
- Salas MA, Valverde CA, Sanchez G, Said M, Rodriguez JS, Portiansky EL, Kaetzel MA, Dedman JR, Donoso P, Kranias EG, Mattiazzi A (2010) The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* **48**(6): 1298-1306
- Saleem A, Adhihetty PJ, Hood DA (2009) Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol Genomics* **37**(1): 58-66
- Sanchez-Ramos C, Tierrez A, Fabregat-Andres O, Wild B, Sanchez-Cabo F, Arduini A, Dopazo A, Monsalve M (2011) PGC-1alpha regulates translocated in liposarcoma activity: role in oxidative stress gene expression. *Antioxid Redox Signal* **15**(2): 325-337

- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL, Spiegelman BM (2006) PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(44): 16260-16265
- Sanlioglu S, Williams CM, Samavati L, Butler NS, Wang G, McCray PB, Jr., Ritchie TC, Hunninghake GW, Zandi E, Engelhardt JF (2001) Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor-alpha secretion through IKK regulation of NF-kappa B. *J Biol Chem* **276**(32): 30188-30198
- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN (2001) Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* **120**(5): 1183-1192
- Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* **283**(5407): 1488-1493
- Satoh K, Berk BC, Shimokawa H (2011) Vascular-derived reactive oxygen species for homeostasis and diseases. *Nitric Oxide* **25**(2): 211-215
- Scarpulla RC (2002) Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1576**(1-2): 1-14
- Scotland RS, Chauhan S, Vallance PJ, Ahluwalia A (2001) An endothelium-derived hyperpolarizing factor-like factor moderates myogenic constriction of mesenteric resistance arteries in the absence of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Hypertension* **38**(4): 833-839
- Schaeffer PJ, Wende AR, Magee CJ, Neilson JR, Leone TC, Chen F, Kelly DP (2004) Calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase activate distinct metabolic gene regulatory programs in cardiac muscle. *J Biol Chem* **279**(38): 39593-39603
- Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M (2004) Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg* **239**(2): 220-231
- Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, op den Winkel M, Fraunberger P, Bilzer M (2003) Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: a novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *Hepatology* **37**(2): 286-295
- Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinec M, Oakeley EJ, Kralli A (2004) The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(17): 6472-6477
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS (2005) Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* **308**(5730): 1909-1911
- Schulz E, Dopheide J, Schuhmacher S, Thomas SR, Chen K, Daiber A, Wenzel P, Munzel T, Keaney JF, Jr. (2008a) Suppression of the JNK pathway by induction of a metabolic stress response prevents vascular injury and dysfunction. *Circulation* **118**(13): 1347-1357
- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T (2008b) Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* **10**(6): 1115-1126
- Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Fleischer B, Galle PR (2006) The role of apoptosis versus oncotic necrosis in liver injury: facts or faith? *J Hepatol* **44**(5): 984-993

- Schwabe RF, Brenner DA (2006) Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- α -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(4): G583-589
- Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchì E, Zani M, Feccia M, Mancini M, Petrozza V, Cossarizza A, Gallo P, Taylor RW, d'Amati G (2007) Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol* **50**(14): 1362-1369
- Segal AW, Shatwell KP (1997) The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Ann N Y Acad Sci* **832**: 215-222
- Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K (2002) In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* **37**(1): 56-62
- Selivanov VA, Votyakova TV, Pivtoraiko VN, Zeak J, Sukhomlin T, Trucco M, Roca J, Cascante M (2011) Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain. *PLoS Comput Biol* **7**(3): e1001115
- Selzner M, Selzner N, Jochum W, Graf R, Clavien PA (2007) Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver Transpl* **13**(3): 382-390
- Semple RK, Crowley VC, Sewter CP, Laudes M, Christodoulides C, Considine RV, Vidal-Puig A, O'Rahilly S (2004) Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1 α is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**(1): 176-179
- Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* **275**(27): 20346-20354
- Serafin A, Rosello-Catafau J, Prats N, Gelpi E, Rodes J, Peralta C (2004) Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion. *Hepatology* **39**(3): 688-698
- Serafin A, Rosello-Catafau J, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Peralta C (2002) Ischemic preconditioning increases the tolerance of Fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am J Pathol* **161**(2): 587-601
- Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT (2001) Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* **181**(2): 160-166
- Serviddio G, Bellanti F, Sastre J, Vendemiale G, Altomare E (2010) Targeting mitochondria: a new promising approach for the treatment of liver diseases. *Curr Med Chem* **17**(22): 2325-2337
- Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Vina J, Vendemiale G, Altomare E (2008) Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med* **29**(1-2): 22-35
- Seyfried TN, Shelton LM (2010) Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)* **7**: 7
- Sherer TB, Richardson JR, Testa CM, Seo BB, Panov AV, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Miller GW, Greenamyre JT (2007) Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *J Neurochem* **100**(6): 1469-1479
- Shibanuma M, Arata S, Murata M, Nose K (1995) Activation of DNA synthesis and expression of the JE gene by catalase in mouse osteoblastic cells: possible involvement of hydrogen peroxide in negative growth regulation. *Exp Cell Res* **218**(1): 132-136

- Shin DJ, Campos JA, Gil G, Osborne TF (2003) PGC-1alpha activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* **278**(50): 50047-50052
- Shoag J, Arany Z (2010) Regulation of hypoxia-inducible genes by PGC-1 alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(4): 662-666
- Sihag S, Cresci S, Li AY, Sucharov CC, Lehman JJ (2009) PGC-1alpha and ERRalpha target gene downregulation is a signature of the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* **46**(2): 201-212
- Silverman HS, Stern MD (1994) Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc Res* **28**(5): 581-597
- Simbula G, Columbano A, Ledda-Columbano GM, Sanna L, Deidda M, Diana A, Pibiri M (2007) Increased ROS generation and p53 activation in alpha-lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. *Apoptosis* **12**(1): 113-123
- Sindram D, Rudiger HA, Upadhyia AG, Strasberg SM, Clavien PA (2002) Ischemic preconditioning protects against cold ischemic injury through an oxidative stress dependent mechanism. *J Hepatol* **36**(1): 78-84
- Singh U, Jialal I (2006) Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* **13**(3): 129-142
- Smith MK, Mooney DJ (2007) Hypoxia leads to necrotic hepatocyte death. *J Biomed Mater Res A* **80**(3): 520-529
- Solaini G, Harris DA (2005) Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J* **390**(Pt 2): 377-394
- Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR (2005) A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* **54**(7): 1926-1933
- Speckmann B, Walter PL, Alili L, Reinehr R, Sies H, Klotz LO, Steinbrenner H (2008) Selenoprotein P expression is controlled through interaction of the coactivator PGC-1alpha with FoxO1a and hepatocyte nuclear factor 4alpha transcription factors. *Hepatology* **48**(6): 1998-2006
- Spiegelman BM (2007) Transcriptional control of energy homeostasis through the PGC1 coactivators. *Novartis Found Symp* **286**: 3-6; discussion 6-12, 162-163, 196-203
- Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M (2003) Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **38**(1): 244-251
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* **277**(47): 44784-44790
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* **127**(2): 397-408
- St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, Spiegelman BM (2003) Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem* **278**(29): 26597-26603
- Stadtman ER (2006) Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* **40**(12): 1250-1258

- Staniek K, Nohl H (2000) Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta* **1460**(2-3): 268-275
- Stocker R, Huang A, Jeranian E, Hou JY, Wu TT, Thomas SR, Keaney JF, Jr. (2004) Hypochlorous acid impairs endothelium-derived nitric oxide bioactivity through a superoxide-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(11): 2028-2033
- Storey KB (2003) Mammalian hibernation. Transcriptional and translational controls. *Adv Exp Med Biol* **543**: 21-38
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**(5234): 296-299
- Suzuki T, Yoshidome H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Takeuchi D, Kato A, Furukawa K, Yoshitomi H, Iida A, Dochi T, Miyazaki M (2011) Hepatocyte apoptosis is enhanced after ischemia/reperfusion in the steatotic liver. *J Clin Biochem Nutr* **48**(2): 142-148
- Syriani E, Morales M, Gamez J (2011) FUS/TLS gene mutations are the second most frequent cause of familial ALS in the Spanish population. *Amyotroph Lateral Scler* **12**(2): 118-123
- Szocs K (2004) Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys* **23**(3): 265-295
- Tan AY, Manley JL (2009) The TET family of proteins: functions and roles in disease. *J Mol Cell Biol* **1**(2): 82-92
- Taniai H, Hines IN, Bharwani S, Maloney RE, Nimura Y, Gao B, Flores SC, McCord JM, Grisham MB, Aw TY (2004) Susceptibility of murine periportal hepatocytes to hypoxia-reoxygenation: role for NO and Kupffer cell-derived oxidants. *Hepatology* **39**(6): 1544-1552
- Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S, Shimamoto K, Horio Y (2010) Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *J Biol Chem* **285**(11): 8375-8382
- Tateishi T, Hokonohara T, Yamasaki R, Miura S, Kikuchi H, Iwaki A, Tashiro H, Furuya H, Nagara Y, Ohyagi Y, Nukina N, Iwaki T, Fukumaki Y, Kira JI (2009) Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with FUS mutation. *Acta Neuropathol* **119**(3): 355-364
- Teoh N, Dela Pena A, Farrell G (2002) Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* **36**(1): 94-102
- Teramoto T, Fujita T, Kawamori R, Miyazaki S, Teramukai S, Igarashi M (2008) OMEGA study: design, baseline data, metabolic syndrome prevalence in a large-scale observational study of hypertensive patients: The Olmesartan Mega Study to Determine the Relationship between Cardiovascular Endpoints and Blood Pressure Goal Achievement study. *Hypertens Res* **31**(11): 2011-2017
- Thandavarayan RA, Watanabe K, Ma M, Gurusamy N, Veeraveedu PT, Konishi T, Zhang S, Muslin AJ, Kodama M, Aizawa Y (2009) Dominant-negative p38alpha mitogen-activated protein kinase prevents cardiac apoptosis and remodeling after streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**(3): H911-919
- Theodoraki K, Tympa A, Karmaniolou I, Tsaroucha A, Arkadopoulos N, Smyrniotis V (2011) Ischemia/reperfusion injury in liver resection: a review of preconditioning methods. *Surg Today* **41**(5): 620-629

- Tien Nguyen-nhu N, Knoop B (2003) Mitochondrial and cytosolic expression of human peroxiredoxin 5 in *Saccharomyces cerevisiae* protect yeast cells from oxidative stress induced by paraquat. *FEBS Lett* **544**(1-3): 148-152
- Tirosch O, Ilan E, Anavi S, Ramadori G, Madar Z (2009) Nutritional lipid-induced oxidative stress leads to mitochondrial dysfunction followed by necrotic death in FaO hepatocytes. *Nutrition* **25**(2): 200-208
- Trifunovic A, Hansson A, Wredenberg A, Rovio AT, Dufour E, Khvorostov I, Spelbrink JN, Wibom R, Jacobs HT, Larsson NG (2005) Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(50): 17993-17998
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly YM, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**(6990): 417-423
- Turman MA, Bates CM (1997) Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail* **19**(1): 47-60
- Turner C, Schapira AH (2010) Mitochondrial matters of the brain: the role in Huntington's disease. *J Bioenerg Biomembr* **42**(3): 193-198
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**(Pt 2): 335-344
- Uchino S, Yamaguchi Y, Furuhashi T, Wang FS, Zhang JL, Okabe K, Kihara S, Yamada S, Mori K, Ogawa M (2004) Steatotic liver allografts up-regulate UCP-2 expression and suffer necrosis in rats. *J Surg Res* **120**(1): 73-82
- Ugucioni G, Hood DA (2011) The importance of PGC-1alpha in contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **300**(2): E361-371
- Uranishi H, Tetsuka T, Yamashita M, Asamitsu K, Shimizu M, Itoh M, Okamoto T (2001) Involvement of the pro-oncoprotein TLS (translocated in liposarcoma) in nuclear factor-kappa B p65-mediated transcription as a coactivator. *J Biol Chem* **276**(16): 13395-13401
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* **7**(1): 65-74
- Valko M, Morris H, Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**(10): 1161-1208
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**(1): 1-40
- Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M (2005) PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* **66**(3): 562-573
- Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE (2006) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* **444**(7121): 875-880
- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P, Ganesalingam J, Williams KL, Tripathi V, Al-Saraj S, Al-Chalabi A, Leigh PN, Blair IP, Nicholson G, de Belleruche J, Gallo JM, Miller CC, Shaw CE (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* **323**(5918): 1208-1211

- Vega RB, Huss JM, Kelly DP (2000) The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* **20**(5): 1868-1876
- Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB (2000) Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* **275**(21): 16258-16266
- Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quinones L, Varela N, Contreras J, Lazarte R, Csendes A, Rojas J, Maluenda F, Burdiles P, Diaz JC, Smok G, Thielemann L, Poniachik J (2004) Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)* **106**(3): 261-268
- Vila-Petroff M, Salas MA, Said M, Valverde CA, Sapia L, Portiansky E, Hajjar RJ, Kranias EG, Mundina-Weilenmann C, Mattiazzi A (2007) CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **73**(4): 689-698
- von Heesen M, Seibert K, Hulser M, Scheuer C, Wagner M, Menger MD, Schilling MK, Moussavian MR (2011) Multidrug donor preconditioning protects steatotic liver grafts against ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*
- Vousden KH, Ryan KM (2009) p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* **9**(10): 691-700
- Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK (1994) Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* **13**(11): 1127-1136
- Wang TN, Huang MC, Lin HL, Hsiang CH, Ko AM, Chang WT, Ko YC (2007) UCP2 A55V variant is associated with obesity and related phenotypes in an aboriginal community in Taiwan. *Int J Obes (Lond)* **31**(11): 1746-1752
- Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, Tempst P, Rosenfeld MG, Glass CK, Kurokawa R (2008) Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* **454**(7200): 126-130
- Wang Y, Xu Y, Wang H, Xue P, Li X, Li B, Zheng Q, Sun G (2009) Arsenic induces mitochondria-dependent apoptosis by reactive oxygen species generation rather than glutathione depletion in Chang human hepatocytes. *Arch Toxicol* **83**(10): 899-908
- Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* **113**(2): 159-170
- Watabe S, Hiroi T, Yamamoto Y, Fujioka Y, Hasegawa H, Yago N, Takahashi SY (1997) SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur J Biochem* **249**(1): 52-60
- Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V, Kelly DP (2005) PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol* **25**(24): 10684-10694
- Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, Spiegelman BM, Moraes CT (2009) Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(48): 20405-20410

- West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS, Ghosh S (2011) TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* **472**(7344): 476-480
- Whaley-Connell A, McCullough PA, Sowers JR (2011) The role of oxidative stress in the metabolic syndrome. *Rev Cardiovasc Med* **12**(1): 21-29
- Widlansky ME, Gutterman DD (2011) Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* **15**(6): 1517-1530
- Winklhofer KF, Haass C (2010) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* **1802**(1): 29-44
- Won JC, Park JY, Kim YM, Koh EH, Seol S, Jeon BH, Han J, Kim JR, Park TS, Choi CS, Lee WJ, Kim MS, Lee IK, Youn JH, Lee KU (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha overexpression prevents endothelial apoptosis by increasing ATP/ADP translocase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(2): 290-297
- Wong R, Aponte AM, Steenbergen C, Murphy E (2010) Cardioprotection leads to novel changes in the mitochondrial proteome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**(1): H75-91
- Wu D, Cederbaum AI (2009) Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* **29**(2): 141-154
- Wu N, Yin L, Hanniman EA, Joshi S, Lazar MA (2009) Negative feedback maintenance of heme homeostasis by its receptor, Rev-erbalpha. *Genes Dev* **23**(18): 2201-2209
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**(1): 115-124
- Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, Takahashi R, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M (2001) Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* **298**(3): 894-899
- Yakes FM, Van Houten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(2): 514-519
- Yang H, Jin X, Wai Kei Lam C, Yan SK (2011) Review: Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med*
- Yang L, Embree LJ, Hickstein DD (2000) TLS-ERG leukemia fusion protein inhibits RNA splicing mediated by serine-arginine proteins. *Mol Cell Biol* **20**(10): 3345-3354
- Yang L, Embree LJ, Tsai S, Hickstein DD (1998) Oncoprotein TLS interacts with serine-arginine proteins involved in RNA splicing. *J Biol Chem* **273**(43): 27761-27764
- Yang X, Cohen MV, Downey JM (2010) Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther* **24**(3): 225-234
- Yang X, Enerback S, Smith U (2003) Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res* **11**(10): 1182-1191

- Yang Y, Zhu WZ, Joiner ML, Zhang R, Oddis CV, Hou Y, Yang J, Price EE, Gleaves L, Eren M, Ni G, Vaughan DE, Xiao RP, Anderson ME (2006) Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**(6): H3065-3075
- Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB (1993) Preconditioning the human myocardium. *Lancet* **342**(8866): 276-277
- Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW (1998) Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* **66**(2): 152-157
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**(6852): 131-138
- Yoon JC, Xu G, Deeney JT, Yang SN, Rhee J, Puigserver P, Levens AR, Yang R, Zhang CY, Lowell BB, Berggren PO, Newgard CB, Bonner-Weir S, Weir G, Spiegelman BM (2003) Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. *Dev Cell* **5**(1): 73-83
- Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K (1998) Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning. *Br J Surg* **85**(12): 1636-1640
- Young TA, Cunningham CC, Bailey SM (2002) Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Arch Biochem Biophys* **405**(1): 65-72
- Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, Sun XM, Zheng SH, Li X (2005) Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* **11**(12): 1825-1828
- Yuzawa H, Fujioka H, Mizoe A, Azuma T, Furui J, Nishikawa M, Hashida M, Kanematsu T (2005) Inhibitory effects of safe and novel SOD derivatives, galactosylated-SOD, on hepatic warm ischemia/reperfusion injury in pigs. *Hepatogastroenterology* **52**(63): 839-843
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* **33**(3): 337-349
- Zhang P, Liu C, Zhang C, Zhang Y, Shen P, Zhang J, Zhang CY (2005) Free fatty acids increase PGC-1alpha expression in isolated rat islets. *FEBS Lett* **579**(6): 1446-1452
- Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev* **18**(2): 157-169
- Zhang Y, Huypens P, Adamson AW, Chang JS, Henagan TM, Boudreau A, Lenard NR, Burk D, Klein J, Perwitz N, Shin J, Fasshauer M, Kralli A, Gettys TW (2009) Alternative mRNA splicing produces a novel biologically active short isoform of PGC-1alpha. *J Biol Chem* **284**(47): 32813-32826
- Zhao K, Zhao GM, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW, Szeto HH (2004) Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J Biol Chem* **279**(33): 34682-34690
- Zhou W, Zhang Y, Hosch MS, Lang A, Zwacka RM, Engelhardt JF (2001) Subcellular site of superoxide dismutase expression differentially controls AP-1 activity and injury in mouse liver following ischemia/reperfusion. *Hepatology* **33**(4): 902-914

- Zhou Y, Kok KH, Chun AC, Wong CM, Wu HW, Lin MC, Fung PC, Kung H, Jin DY (2000a) Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **268**(3): 921-927
- Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH (2000b) Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4): 1784-1789
- Zhu L, Wang Q, Zhang L, Fang Z, Zhao F, Lv Z, Gu Z, Zhang J, Wang J, Zen K, Xiang Y, Wang D, Zhang CY (2010) Hypoxia induces PGC-1alpha expression and mitochondrial biogenesis in the myocardium of TOF patients. *Cell Res* **20**(6): 676-687
- Zinszner H, Sok J, Immanuel D, Yin Y, Ron D (1997) TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* **110 (Pt 15)**: 1741-1750
- Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, Shulman GI (2002) AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 15983-15987
- Zuin A, Carmona M, Morales-Ivorra I, Gabrielli N, Vivancos AP, Ayte J, Hidalgo E (2010) Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *Embo J* **29**(5): 981-991
- Zwacka RM, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt JF (1998) Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor kappaB independently of IkappaB degradation. *Hepatology* **28**(4): 1022-1030
- Zweier JL, Talukder MA (2006) The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **70**(2): 181-190

ANEXO

PGC-1 α Regulates Translocated in Liposarcoma Activity: Role in Oxidative Stress Gene Expression

Cristina Sánchez-Ramos,¹ Alberto Tierrez,¹ Oscar Fabregat-Andrés,² Brigitte Wild,¹ Fatima Sánchez-Cabo,¹ Alessandro Arduini,³ Ana Dopazo,¹ and María Monsalve^{1,4}

Abstract

Translocated in liposarcoma (TLS) is a poorly characterized multifunctional protein involved in the genotoxic response. TLS regulates gene expression at several steps, including splicing and mRNA transport, possibly connecting transcriptional and posttranscriptional events. **Aims:** In this study we aimed to identify molecular targets and regulatory partners of TLS. **Results and Innovation:** Here we report that TLS transcriptionally regulates the expression of oxidative stress protection genes. This regulation requires interaction with the transcriptional coactivator peroxisome proliferator activated receptor γ -coactivator 1 α (PGC-1 α), a master regulator of mitochondrial function that coordinately induces the expression of genes involved in detoxification of mitochondrial reactive oxygen species (ROS). Microarray gene expression analysis showed that TLS transcriptional activity is impaired in the absence of PGC-1 α , and is thus largely dependent on PGC-1 α . **Conclusion:** These results suggest the existence of a regulatory circuit linking the control of ROS detoxification to the coordinated cross-talk between oxidative metabolism and the cellular response to genomic DNA damage. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 325–337.

Introduction

UNTIL RECENTLY, the cellular responses to genomic DNA damage and to oxidative stress resulting from excessive mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production have been considered as fundamentally separate. However, recent reports on key transcriptional sensors such as p53 indicate that some common regulatory networks may connect DNA damage to mitochondria and oxidative stress responses (55). How these two fundamental pathways for cell survival are connected is still poorly understood.

Translocated in liposarcoma (TLS; also called fused in sarcoma [FUS]) is a gene expression regulator recently shown to be involved in the cellular response to DNA damage. TLS was originally discovered as part of a fusion protein with the transcription factor C/EBP homologous protein, deriving from a characteristic chromosomal translocation in human liposarcomas. TLS is part of the TET family of RNA-binding proteins, which also includes Ewing's sarcoma and TAF15/TAFII68. TET proteins appear to function in at least three gene expression processes—transcription, splicing, and mRNA transport—and might also play a role in DNA repair. The amino terminus of all TET family members is rich in glutamine, serine, and glycine residues and can function as a transcriptional activation domain (7, 59). The most conserved

region in TET proteins is an RNp-type RNA-binding domain (RBD) that directs sequence-specific RNA binding. The TET proteins carboxy-terminus contain RGG repeats that might increase RNA affinity that are thought to contribute to RNA binding and might also be the site of post-translational modifications that regulate RNA binding or protein–protein

Innovation

Although excessive ROS production results in DNA damage, the mechanisms that link ROS homeostasis to the genotoxic response are largely unknown. To investigate possible links between ROS detoxification mechanisms and DNA damage sensing, we conducted a yeast two-hybrid screen to identify PGC-1 α -interacting partners. TLS was identified as a PGC-1 α cofactor. Further experiments showed that TLS is a direct transcriptional regulator of several oxidative stress protection genes, and that this regulation depends on TLS interaction with PGC-1 α . Moreover, whole-genome gene expression microarray analysis showed that TLS transcriptional activity is markedly reduced in PGC-1 α ^{−/−} cells. These results support the notion that TLS links responses to DNA damage and oxidative stress to the metabolic control provided by PGC-1 α .

¹Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid, Spain.

²Hospital General de Valencia, Valencia, Spain.

³Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Valencia, Spain.

⁴Instituto de Investigaciones Biológicas “Alberto Sols” (CSIC) Madrid, Spain.

interactions (11), and a Cys2-Cys2 zinc finger (52) that folds with the RBD into protease-resistant structures, and is likely to participate in RNA binding (24). TET proteins can bind not only RNA but also single-stranded and possibly double-stranded DNA. TLS promotes D-loop formation, a process whereby a single strand of DNA invades and pairs with one of the strands of a double-stranded region of DNA, a process necessary for DNA repair and recombination (5, 8).

Several reports link TLS activity to the cellular response to DNA damage. TLS knockout mice have unstable genomes as a result of chromosomal pairing defects and enhanced sensitivity to radiation (21, 27). Conversely, cells lacking TLS do not undergo appropriate DNA repair, resulting in genomic instability. Two kinases activated by damaged DNA, c-ABL and ataxia telangiectasia mutated (ATM), target TLS (17, 39). TLS also interacts with the stress response transcription factor YB-1 (28). A recent report provided a mechanism for TLS activity, but also functionally connected DNA damage sensing, RNA binding, and transcriptional regulation of the first fully characterized TLS transcriptional target, cyclin D1. The authors showed that activation of TLS in response to DNA damage can cause TLS to bind noncoding RNA transcripts that originate upstream of the cyclin D1 promoter. This binding facilitates the recruitment of TLS to the cyclin D1 promoter, resulting in transcriptional inactivation and subsequent cell cycle arrest (56).

A major cause of DNA damage is oxidative stress resulting from inefficient detoxification of mitochondrial ROS, suggesting the possibility of regulatory cross-talk between the oxidative stress response and the sensing of DNA damage. The transcriptional coactivator peroxisome proliferator activated receptor γ -coactivator 1 α (PGC-1 α) is a master regulator of oxidative metabolism and mitochondrial function (20) that regulates expression of a set of genes involved in detoxification of mitochondrial ROS (54). The physiological role of PGC-1 α is particularly well characterized in liver, where the induction of PGC-1 α expression is a critical regulatory event leading to the activation of energy metabolic pathways that serve to increase ATP production and exert homeostatic control, especially in the context of fasting (30, 43, 48, 50).

Results

TLS interacts with and coactivates PGC-1 α

We aimed to identify proteins that modulate the activity of PGC-1 α on oxidative stress protection genes. To identify candidate PGC-1 α cofactors we used the C-terminal domain (CTD; aa 580–797) as bait in a yeast two-hybrid screen of a human cDNA library. The PGC-1 α CTD mediates the interaction of PGC-1 α with FoxO3a, its DNA-binding partner in the regulation of oxidative stress genes (37). Of 32 positive clones, three were identified as TLS. TLS is an ubiquitously expressed multifunctional protein proposed to have transcriptional cofactor activity (19, 41, 53, 56) and to orchestrate the cell response to DNA damage (27). The potential of TLS as a transcriptional cofactor and its link to DNA damage prompted our further studies.

To confirm direct interaction of TLS with PGC-1 α and to map the domains of PGC-1 α involved, we generated a glutathione-S-transferase (GST)-TLS fusion protein and tested its ability to pull down [³⁵S]-radiolabeled PGC-1 α or its CTD mutant versions Δ RRM (Δ 677–710), Δ SR (Δ 564–634), Δ SR/

Δ RRM (Δ 564–710), and Δ CTD (1–564) (34). TLS pulled down PGC-1 α , and this interaction was preserved in the Δ RRM, Δ SR, and Δ SR/ Δ RRM mutants, indicating that TLS directly binds PGC-1 α *in vitro* and that this interaction does not require the RBD or the serine-arginine rich region. TLS did not pull down the PGC-1 α - Δ CTD mutant, confirming the yeast two hybrid screen and showing that there are no additional TLS binding sites outside the PGC-1 α -CTD domain (Supplementary Fig. S1; Supplementary Data available online at www.liebertonline.com/ars).

To identify the TLS domain that interacts with PGC-1 α -CTD, we performed the reverse pull down assay, using a GST-PGC-1 α -CTD fusion protein (37), to bind *in vitro* generated [³⁵S]-radiolabeled TLS proteins. We generated two complementary TLS fragments, one corresponding to the N-terminal domain (NTD) (1–275 aa) and another corresponding to the CTD (residues 269–525) (11). Although PGC-1 α -CTD pulled down TLS-CTD, we detected no binding of PGC-1 α -CTD to TLS-NTD (Fig. 1A). To map the binding site within TLS-CTD, we generated a series of TLS C-terminal deletions. Each deletion removed an additional TLS subdomain. Deletion of the C-terminal-most 52 amino acids of TLS (corresponding to the third RGG domain [RGG3]) completely abolished binding (Fig. 1B). RGG domains are rich in Arg-Gly-Gly triplets and are proposed to regulate the specificity of adjacent RBDs (RNA recognition motif [RRM]) (11, 29), but have also been shown to engage in protein–protein interactions (10, 13). We therefore conclude that TLS interacts with PGC-1 α directly through its C-terminal RGG domain.

To determine whether TLS and PGC-1 α form a stable complex in cells, we transiently cotransfected 293T cells with Flag-tagged TLS together with HA-tagged full-length PGC-1 α or its CTD variants. TLS was detected in PGC-1 α immunoprecipitates in cells expressing full-length PGC-1 α and all mutant variants except PGC-1- Δ CTD (Fig. 1C). That this interaction occurs normally in cells and was not a consequence of forced TLS/PGC-1 α expression was confirmed in primary hepatocytes. TLS was detected in PGC-1 α coimmunoprecipitated material (Fig. 1D). These findings confirm the *in vitro* interaction assays and support the idea that PGC-1 α and TLS interact in living cells, and that the interaction requires the C-terminal 87 PGC-1 α residues but not the RRM and SR (protein domain rich in Ser and Arg) motifs.

We next tested whether TLS binding modulates PGC-1 α transcriptional activity. TLS^{−/−} and TLS^{+/+} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were cotransfected with pGal4-DBD-PGC-1 α (which encodes PGC-1 α fused to the Gal4 DNA binding domain) and the luciferase reporter plasmid 5xUAS-Luc (which contains 5 copies of the Gal4 binding site [5xUAS] in its promoter). PGC-1 α transcriptional activity was lower in TLS^{−/−} cells (Fig. 1E). This decreased activity was rescued by cotransfection with full-length TLS (but not the TLS- Δ 1 mutant), supporting the idea that TLS is a direct transcriptional coactivator of PGC-1 α (Fig. 1E). Similar results were obtained in the rat hepatoma cell line FAO, suggesting that this is not a cell-type-specific phenomenon (Supplementary Fig. S2).

TLS regulates oxidative stress protection genes

TLS has been shown to orchestrate the cellular response to DNA damage, which can result from oxidative stress. To in-

A

TLS (1-525)			TLS-NTD (1-275)			TLS-CTD (269-525)		
Input 1/10	G-PGC-1α CTD	GST	Input 1/10	G-PGC-1α CTD	GST	Input 1/10	G-PGC-1α CTD	GST

B

TLS (1-525)			TLS (1-471)		
Input 1/10	G-PGC-1α CTD	GST	Input 1/10	G-PGC-1α CTD	GST

C

Input

TLS

Loading control

IP: HA (PGC-1α)

PGC-1α - F.L. ΔCTD ΔSR ΔRRM ΔSR/ΔRRM

WB: PGC-1α

TLS

D

INPUT IgG IP (PGC-1α)

TLS

PGC-1α

E

Luciferase arbitrary units

MEFs

PGC-1α - 30ng 60ng 125ng 250ng 500ng

PGC-1α (ng) - 60 125 250 375 500

TLS (1-525)

TLS Δ(1-471)

Luciferase arbitrary units

PGC-1α (ng) - 60 125 250 375 500

TLS (1-525)

TLS Δ(1-471)

We then investigated the influence of endogenous TLS on the mitochondrial detoxification system. First, we compared the expression of the panel of oxidative stress protection genes in TLS^{+/+} and TLS^{-/-} MEFs. TLS-deficient MEFs had lower mRNA levels of all the genes tested (Fig. 3A). Western blotting (WB) confirmed reduced protein expression. The exception

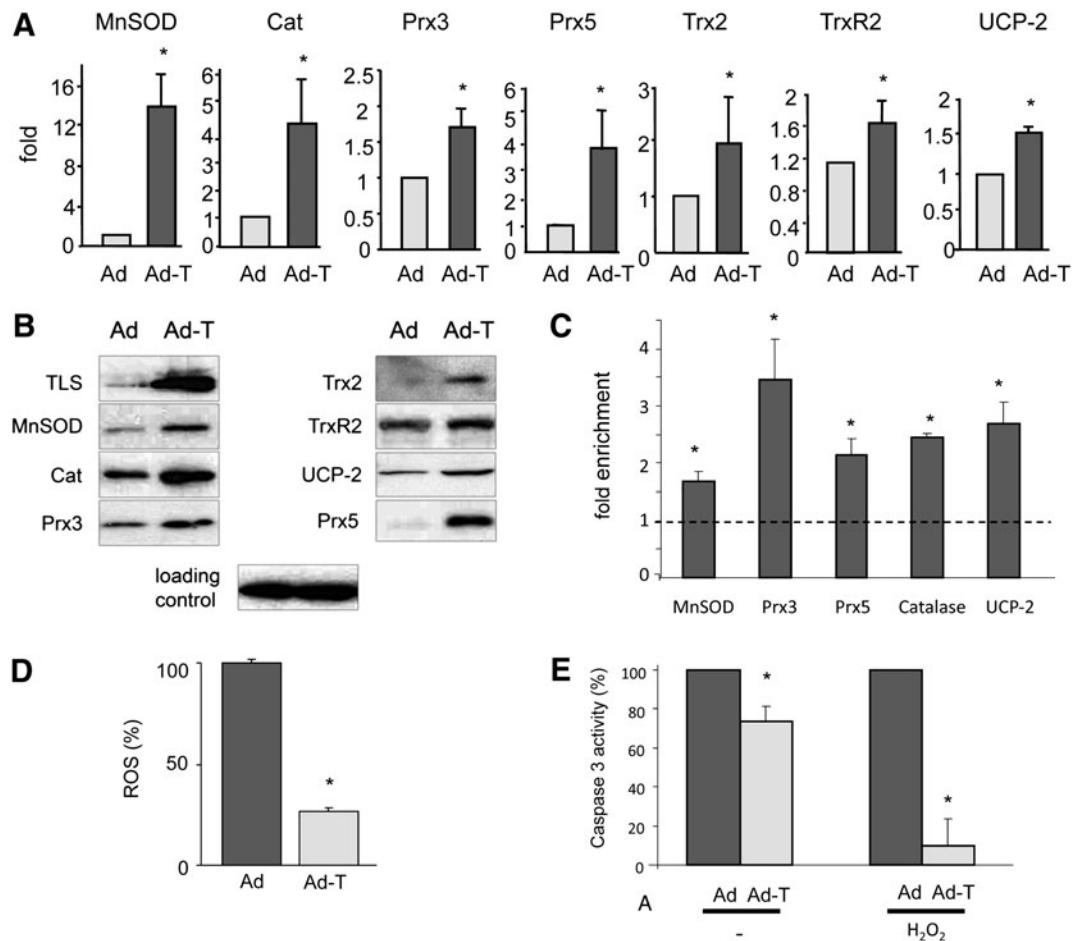


FIG. 2. TLS regulates oxidative stress protection gene expression. (A) Quantitative PCR of retro transcribed cDNA (qRT-PCR) analysis of the expression of genes involved in oxidative stress protection in FAO cells infected with Ad-TLS (Ad-T). Expression is shown as the fold induction above the level in cells infected with control adenovirus (Ad). 18S RNA was used as a loading control. Control samples were assigned the value of 1. (B) Western blot (WB) analysis of oxidative stress protection proteins in FAO cells infected with Ad-T or Ad. (C) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis of TLS binding to the promoter regions of oxidative stress protection genes in FAO cells infected with Ad-T. β -actin was used as a negative control. Control samples were assigned the value of 1. (D) Flow cytometry analysis of intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. Ad-T or Ad-infected FAO cells were loaded with CM-H₂DCFDA, and ROS levels estimated from the fluorescence signal of the CM-H₂DCFDA oxidation product CM-DCF. ROS levels in control samples were assigned the value of 100%. (E) Determination of caspase-3 activity in whole-cell extracts of FAO cells infected with AdT or Ad and treated for the indicated times with 150 μ M H₂O₂. The signal for control cells was assigned the value of 100%. The caspase inhibitor Z-VAD was used as a positive control. Data are means \pm SD. * p < 0.05.

was TrxR2, whose mRNA levels were only marginally reduced and whose protein expression was in fact increased (Fig. 3B). Reduced expression of oxidative stress protection genes was reflected in higher basal levels of ROS in TLS^{-/-} MEFs (Fig. 3C). Similar results were obtained in primary hepatocytes expressing TLS-specific small interference RNA (siRNA). WB confirmed reduced protein expression for all proteins tested (including TrxR2) (Fig. 3). Together, these results indicate that TLS is an important regulator of ROS detoxification and is necessary for the maintenance of the basal expression of oxidative stress protection genes.

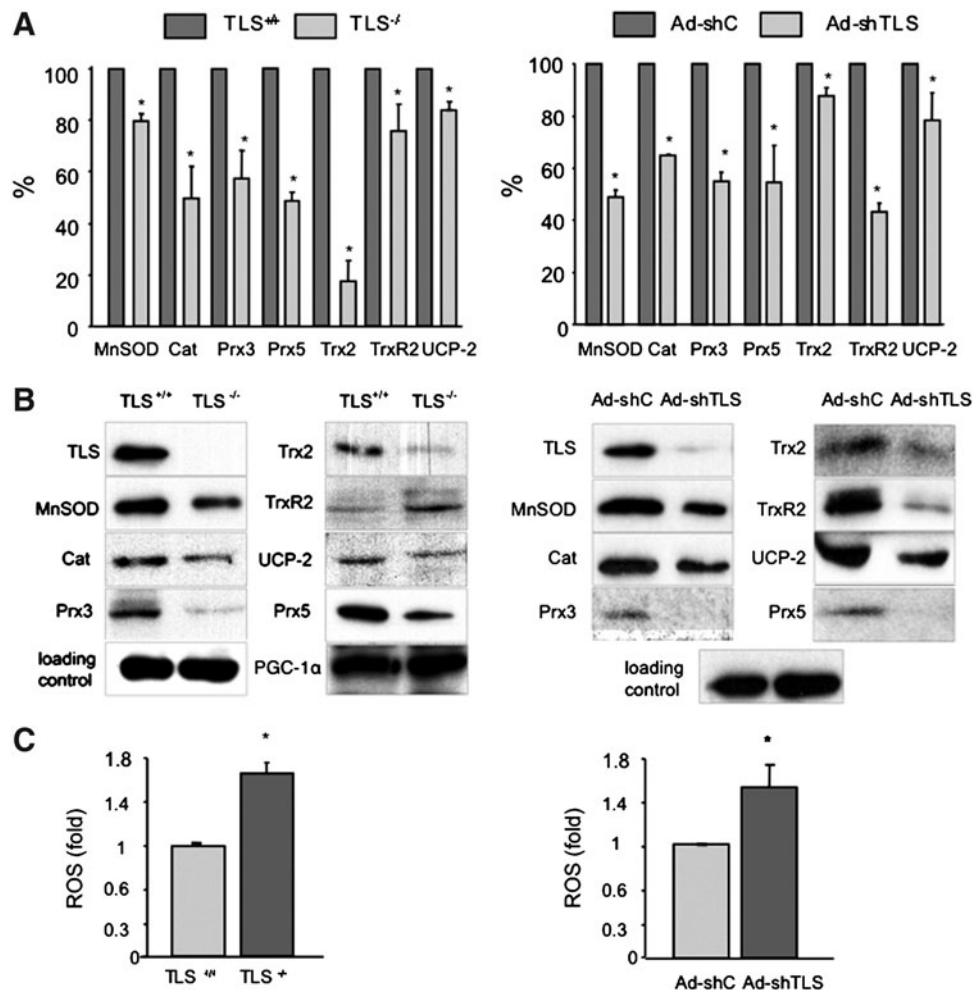
TLS cooperates with PGC-1 α in the regulation of oxidative stress protection genes

The results presented in Figures 1 and 2 show that TLS is a cofactor of PGC-1 α transcriptional activity and that TLS and

PGC-1 α regulate a common group of oxidative stress protection genes. Most strikingly, the ChIP analysis (Fig. 2C) (54) revealed that these factors associate with the same or overlapping promoter regions. We therefore investigated the potential cooperation between TLS and PGC-1 α in the regulation of oxidative stress protection genes.

FAO cells were infected with Ad-T alone or together with Ad-P, which encodes PGC-1 α . The multiplicity of infection (moi) was reduced to a quarter of that in the previous assays to facilitate detection of cooperative effects. Simultaneous expression of both TLS and PGC-1 α resulted in cooperative induction of mRNA and protein expression of all the oxidative stress genes studied both at normal glucose (5 mM) and at high glucose (25 mM) to increase mitochondrial ROS production (Fig. 4A, B). For MnSOD, catalase, Prx5, and Trx2, high glucose induced a higher level of cooperativity, but did not fundamentally alter the induction of Trx2 and UCP-2 and

FIG. 3. TLS regulates oxidative stress protection gene expression. (A) qRT-PCR analysis of the mRNA expression of oxidative stress protection genes in TLS^{+/+} and TLS^{-/-} MEFs (left panel) or in primary hepatocytes infected with Ad-TLS-specific shRNA (shTLS) (encoding TLS sh-RNA) or the corresponding control (right panel). 18S RNA was used as loading control. (B) WB analysis of oxidative stress protection proteins in TLS^{+/+} and TLS^{-/-} MEFs (left panel) or in primary hepatocytes infected with Ad-shTLS or the corresponding control (right panel). β -actin was used as loading control. (C) Intracellular ROS levels in TLS^{+/+} and TLS^{-/-} MEFs (left panel) or in primary hepatocytes infected with Ad-shTLS or the corresponding control (right panel). Levels in TLS^{+/+} and Ad-shControl cells were assigned the value of 100%. Data are means \pm SD. * $p \leq 0.05$.



reduced the induction of Prx3 mRNA. The cooperative effect of coexpressing TLS and PGC-1 α was also seen in a greater reduction of ROS production than in cells expressing either protein alone (Fig. 4C). These results support the hypothesis that TLS and PGC-1 α regulate cooperatively the cellular ROS protection systems.

TLS and PGC-1 α are mutually required for the regulation of oxidative stress gene expression

We next tested whether TLS is necessary for the regulation of oxidative stress genes by PGC-1 α . We infected immortalized TLS^{+/+} and TLS^{-/-} MEFs with Ad-P or control Ad and monitored the induction of oxidative stress gene mRNA and protein expression. In TLS^{+/+} MEFs, PGC-1 α overexpression induced slight but statistically significant increases in the mRNA expression of all the target genes studied (Fig. 5A, left panel). This was accompanied by marked increases in the protein expression of catalase and Trx2 and milder increases in UCP-2, MnSOD, and Prx3 (Fig. 5B, left panel). Prx5 and TR2 expression was not altered (results not shown). In TLS^{-/-} MEFs, PGC-1 α capacity to induce ROS protection genes was drastically reduced. At the mRNA level, only MnSOD induction could be detected. The results were confirmed by WB (Fig. 5A, B, left panels). PGC-1 α overexpression was similarly unable to reduce ROS levels in TLS^{-/-} MEFs (Fig. 5C),

further confirming that PGC-1 α cannot compensate for TLS deficiency.

To determine whether TLS-mediated induction of oxidative protection genes was reciprocally dependent on PGC-1 α , we tested the effect of TLS silencing in primary hepatocytes isolated from PGC-1 α ^{+/+} and PGC-1 α ^{-/-} mice. PGC-1 α ^{-/-} cells have lower expression of several oxidative stress protection genes and increased ROS levels (37, 51). Adenovirally expressed TLS-specific shRNA (shTLS) reduced mRNA and protein expression of oxidative protection genes in PGC-1 α ^{+/+} hepatocytes. This ability was either severely reduced or completely abolished in PGC-1 α ^{-/-} hepatocytes for all genes studied (Fig. 5A, B, right panels). Analysis of ROS levels showed that although TLS knockdown increased ROS in PGC-1 α ^{+/+} hepatocytes, it had only a marginal effect in PGC-1 α ^{-/-} hepatocytes (Fig. 5D), further supporting the notion that TLS activity is dependent on PGC-1 α . ChIP analysis showed that the association of TLS with the promoter regions of Prx3 and Prx5 was drastically reduced in PGC-1 α ^{-/-} hepatocytes. This result suggests that association of TLS to these promoters is mediated by the interaction of TLS with PGC-1 α (Fig. 5E).

TLS transcriptional activity is dependent on PGC-1 α

Apart from the oxidative stress response genes analyzed here, the only validated transcriptional target of TLS is cyclin

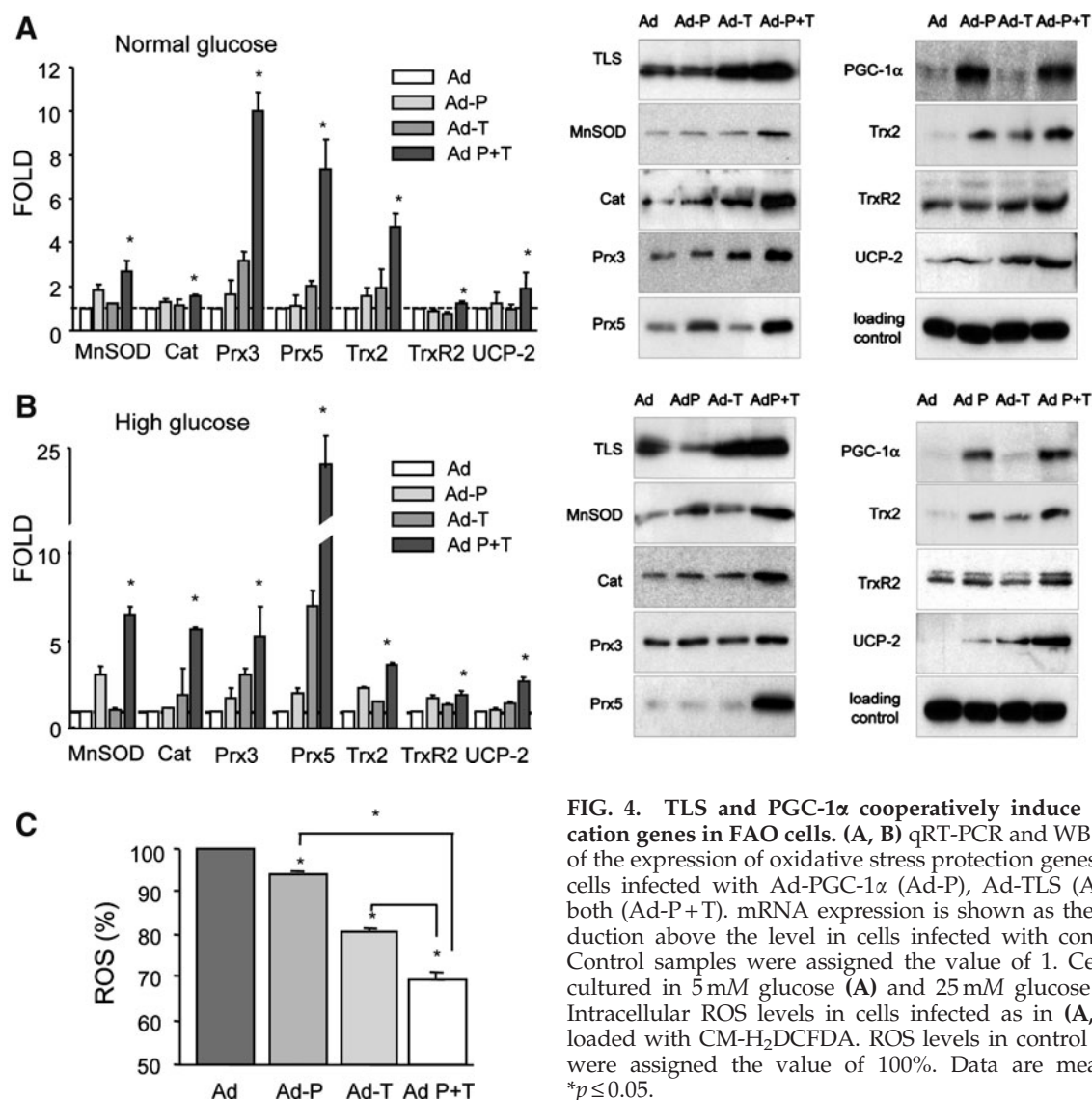


FIG. 4. TLS and PGC-1 α cooperatively induce detoxification genes in FAO cells. (A, B) qRT-PCR and WB analysis of the expression of oxidative stress protection genes in FAO cells infected with Ad-PGC-1 α (Ad-P), Ad-TLS (Ad-T), or both (Ad-P+T). mRNA expression is shown as the fold induction above the level in cells infected with control Ad. Control samples were assigned the value of 1. Cells were cultured in 5mM glucose (A) and 25mM glucose (B). (C) Intracellular ROS levels in cells infected as in (A, B) and loaded with CM-H₂DCFDA. ROS levels in control samples were assigned the value of 100%. Data are means \pm SD. * $p \leq 0.05$.

D1 (56) whose expression is downregulated by TLS. To test whether the dependence of TLS activity on PGC-1 α is restricted to oxidative stress genes or is a more general effect, we carried out whole-genome expression analysis on primary PGC-1 $\alpha^{+/+}$ and PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes infected with shTLS or control Ad. The screen identified 2578 genes differentially expressed in shTLS PGC-1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes but only 1157 in the PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes, 955 of which are common to both sets. Out of the 1050 genes downregulated by shTLS in PGC-1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes, only 253 were also downregulated in PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes (24%), whereas of the 1518 genes upregulated by shTLS in PGC-1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes, 816 (46%) were also upregulated in shTLS in PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes (Fig. 6A). Additionally, while of all the genes differentially expressed only in PGC-1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes, about half of them (49%, 807/1623) were downregulated following TLS knockdown and the other half upregulated; the percentage of genes downregulated in both PGC-1 $\alpha^{+/+}$ and PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes is significantly smaller (26%, 253/955) ($p < 0.001$ χ^2 -test).

These data suggest that TLS activity is significantly reduced in the PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes and also that the dependency of TLS on PGC-1 α is more important for genes that are positively regulated by TLS. However, TLS seems to have some PGC-1 α -independent transcriptional activities and TLS regulation of a small group of genes actually seems to require PGC-1 α inactivation (Fig. 6A).

Supporting this conclusion, scatter plot analysis showed that, on average, if we consider the genes regulated by shTLS only in PGC-1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes (1623), the fold change in expression induced by shTLS in PGC-1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes is two times bigger than in PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes ($R^2 = 0.86$ and Fig. 6B, blue dots). Similarly, if we consider the genes regulated by shTLS only in PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes (201), for those genes the fold change in expression induced by shTLS in PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes is two times bigger than in PGC-1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes, although the dispersion is larger ($R^2 = 0.78$ and Fig. 6B, violet dots). Finally, genes that were differentially regulated by shTLS in both PGC-1 $\alpha^{+/+}$ and PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes (955) had on average the same change in expression

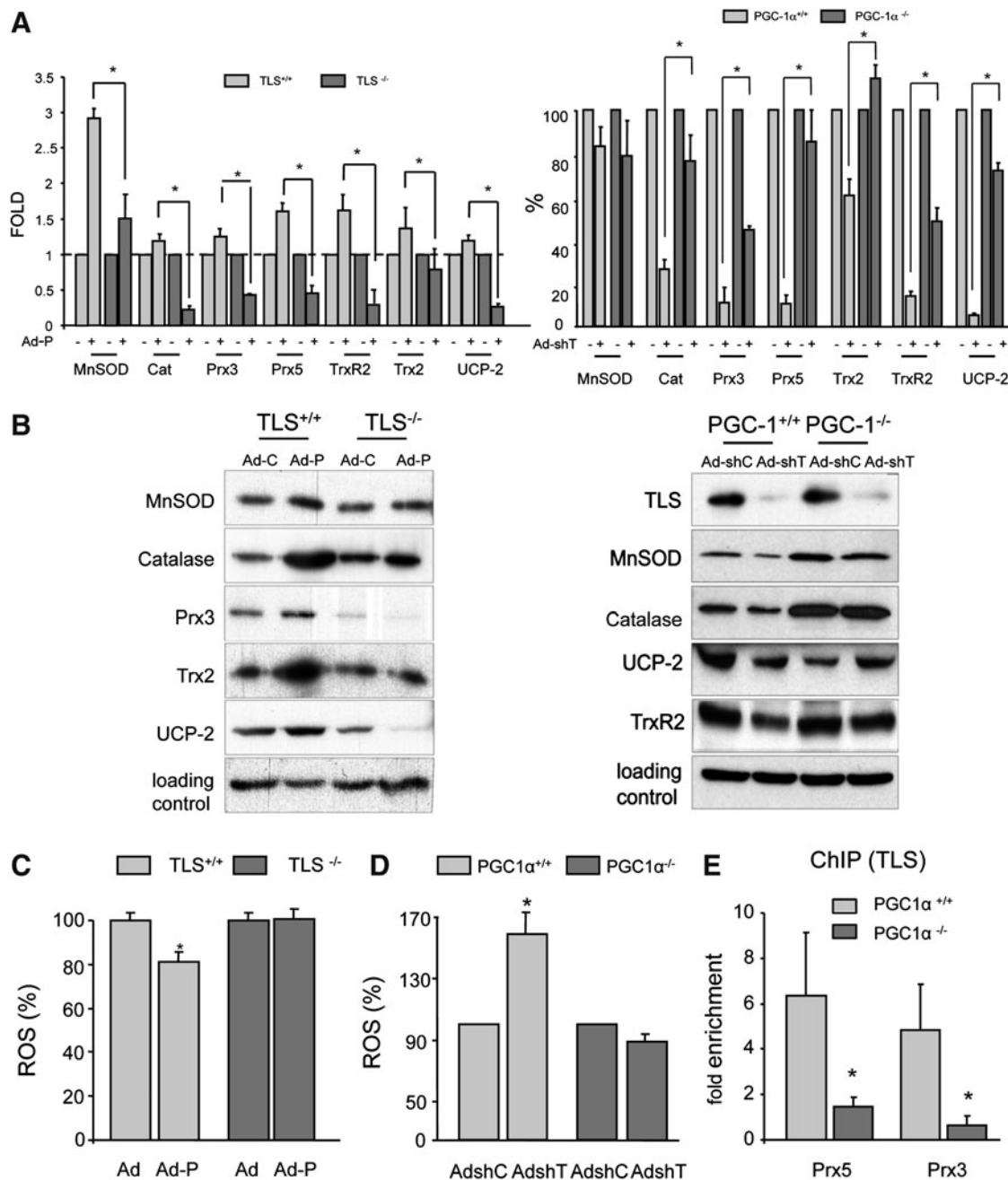


FIG. 5. PGC-1 α and TLS are mutually dependent in the regulation of oxidative stress protection genes. (A, B) qRT-PCR and WB analysis of the induction of oxidative stress protection genes in TLS^{+/+} and TLS^{-/-} MEFs that were infected with PGC-1 α (Ad-P) (left panel) or primary hepatocytes from PGC-1^{+/+} and PGC-1^{-/-} mice infected with Ad-shTLS or the corresponding control. mRNA expression is shown as the fold induction above the level in cells infected with control Ad (left panel) or the relative % (right panel). Control samples were assigned the value of 1 or 100%. (C, D) Intracellular ROS levels in cells infected as in (A, B) and loaded with CM-H₂DCFDA. ROS levels in control samples were assigned the value of 100%. (E) ChIP analysis of TLS binding to the promoter regions of peroxiredoxins 5 and 3 (Prx5 and Prx3) in PGC-1^{+/+} and PGC-1^{-/-} hepatocytes. The CDS of β -actin was used as a negative enrichment control. Data are means \pm SD. * $p < 0.05$.

in response to TLS knock down in PGC-1^{+/+} and PGC-1^{-/-} hepatocytes ($R^2 = 0.96$ and Fig. 6B, black dots).

To identify relevant functions regulated by TLS and their dependency on PGC-1 α , we carried out gene functional analysis of TLS-regulated genes using the Ingenuity software. The analysis showed that TLS regulates the same functional groups

in PGC-1^{+/+} and PGC-1^{-/-} hepatocytes, further supporting the idea that TLS has essentially the same but reduced activities in the absence of PGC-1 α . The analysis showed that TLS (like PGC-1 α) regulates an important number of genes involved in the control of cellular metabolism. This result supports the notion of a strong functional association of TLS and

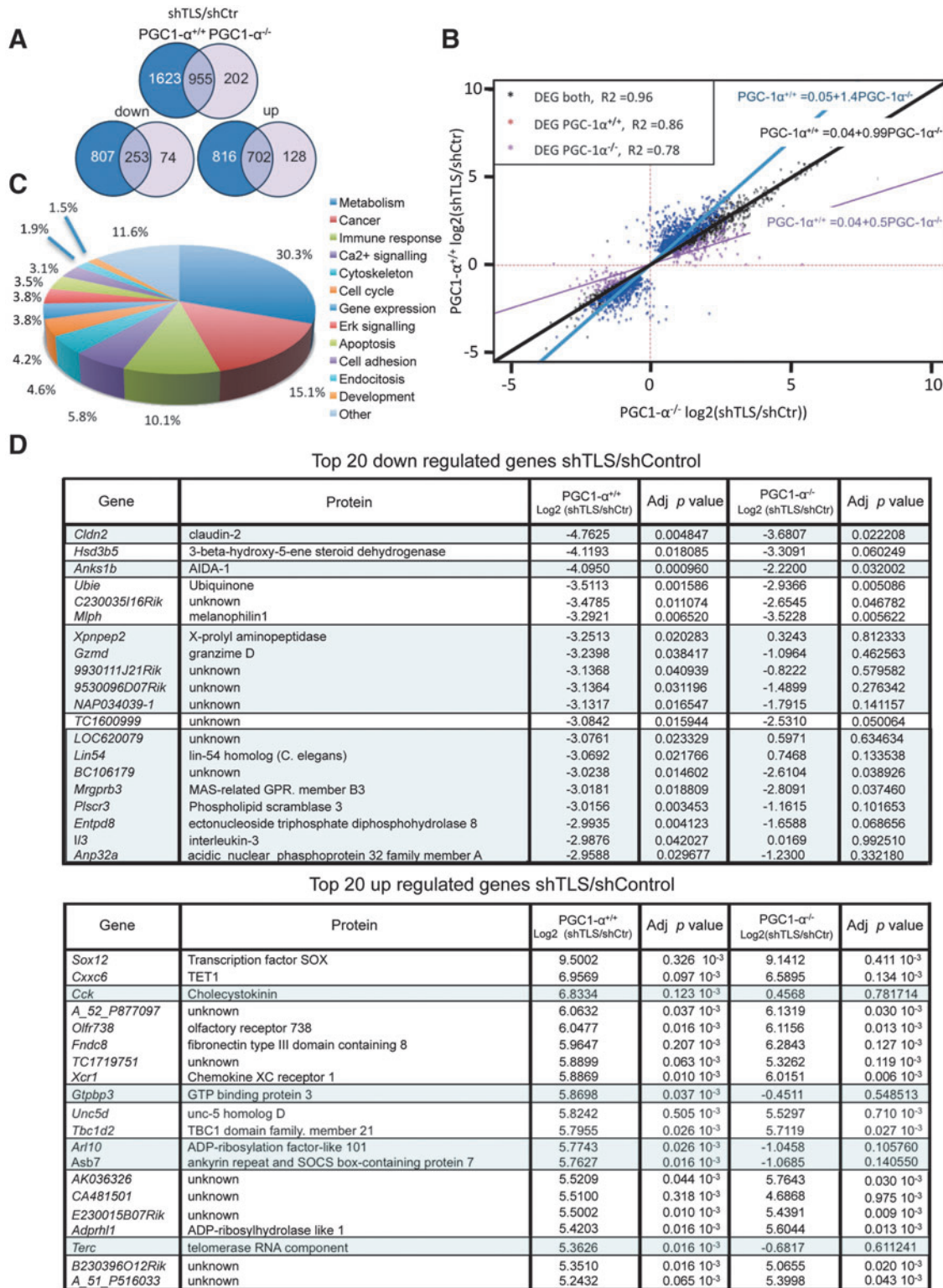


FIG. 6. Genome-wide analysis of TLS gene expression activity and its dependence on PGC1 α . Whole-genome expression arrays were used to evaluate the gene expression changes induced in PGC1 $\alpha^{+/+}$ and PGC1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes by infection with Ad-shTLS or control Ad. (A) The diagrams illustrates the total number of genes differentially down- or upregulated by shTLS in PGC1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes, PGC1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes, or in both. (B) Scatter plot of genes differentially expressed by shTLS: genes shown in blue are genes whose X-fold up- or downregulation in PGC1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes is reduced in PGC1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes; genes shown in black are similarly regulated in PGC1 $\alpha^{+/+}$ and PGC1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes, and violet indicates genes more strongly regulated in PGC1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes. (C) IngenuityTM functional distribution of genes differentially regulated in response to shTLS in PGC1 $\alpha^{+/+}$ and PGC1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes. (D) List of the 20 top genes down- and upregulated by shTLS in PGC1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes. The fold change in PGC1 $\alpha^{+/+}$ and PGC1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes, and the corrected p -values are indicated. Genes that showed over a two-fold difference in the response to TLS small hairpin RNA (shRNA) in PGC1 $\alpha^{+/+}$ /PGC1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes are shown in green.

PGC-1 α regulatory networks. The other major function associated with TLS knockdown is cancer and cell cycle control, in line with the previous identification of TLS as a proto-oncogene and a promoter of cell cycle arrest in response to DNA damage (Fig. 6C). Figure 6D lists the top 20 genes down- and upregulated in response to TLS knockdown and their fold change in PGC-1 $\alpha^{+/+}$ and PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes.

Since the absence of PGC-1 α decreased TLS activity without any overt effect on TLS expression, we examined whether PGC-1 α influences TLS cellular distribution. Due to its involvement in mRNA transport, TLS normally shuttles between the nucleus and the cytosol (16). Immunofluorescence analysis in PGC-1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes confirmed localization of TLS in both the cytosol and the nuclei. The nuclear/cytosol ratio was quite variable between cells within each hepatocyte preparation. Within nuclei, as already described (3, 33), TLS was concentrated in nuclear foci. Nuclear foci might be sites of active transcription or mRNA processing and are a classical feature of factors involved in splicing (58). In PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes, TLS showed a distribution similar to that found in PGC-1 $\alpha^{+/+}$ hepatocytes cells (Fig. 7). Suggesting that impaired TLS activity in PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes cannot be attributed to overt changes in TLS subcellular localization.

Discussion

TLS is a transcriptional coactivator

TLS is best known as a proto-oncogene, but its normal cellular function is still very poorly characterized. Accumulated data indicate that wild-type TLS plays an important role as a genotoxic sensor in the control of cell-cycle arrest. Understanding the mechanisms of TLS transcriptional activity is made complicated by the protein's multifunctional nature. TLS has been shown to modulate transcriptional initiation, RNA processing, and RNA localization. Moreover, the transcriptional activity of TLS has recently been shown to be modulated by scRNAs bound to its RRM (56). Our results show that TLS is a functional partner of the well-characterized transcriptional cofactor PGC-1 α , which is involved in metabolic control, and that TLS transcriptional activity is heavily dependent on PGC-1 α . TLS interacts directly with PGC-1 α and increases PGC-1 α transcriptional activity. These two factors cooperate in the regulation of the expression of oxidative stress protection genes, with each dependent on the other for this regulation.

TLS is a genotoxic sensor that regulates the expression of oxidative stress protection genes

Increased mitochondrial activity results in increased production of ROS that can be harmful to cells. Therefore, induction of antioxidant systems in situations where β -oxidation is activated is crucial. We previously showed that PGC-1 α coordinates the upregulation of mitochondrial function with increased levels of ROS detoxification enzymes (54), thereby preventing oxidative stress when β -oxidation is activated. PGC-1 α mRNA expression is in fact induced by ROS *via* CREB (51). Genotoxic DNA damage is associated with oxidative stress, and is its most deleterious effect. The finding that the DNA damage sensor TLS cooperates with PGC-1 α in the induction of ROS protection genes suggests that PGC-1 α might work as a sensor of oxidative stress-related damage,

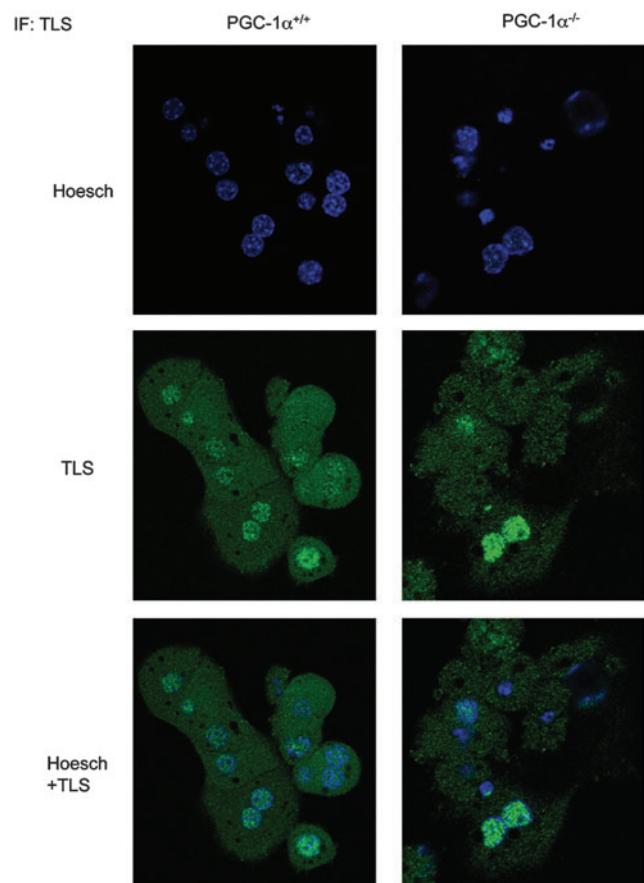


FIG. 7. TLS subcellular localization in PGC-1 $\alpha^{+/+}$ and PGC-1 $\alpha^{-/-}$ hepatocytes. TLS subcellular localization was analyzed by immunofluorescence with specific antibodies.

and provides a novel link between the genotoxic response and metabolic control.

Hepatocytes as a model system of oxidative stress response

We carried out this study using hepatocytes as a model system, since liver is a particularly relevant organ when we consider ROS-related pathogenesis since liver plays a central role in metabolic control and its drug-detoxification activities make it a strong producer of ROS. Mitochondrial and ROS related liver dysfunctions are well characterized, and they range from alcohol-induced liver injury to carcinogenesis (40, 57)

TLS activity heavily relies on PGC-1 α

The idea that the genotoxic stress response is linked to general metabolic control is supported by the microarray analysis, which shows that TLS activity modulates both metabolic and cell-control genes, and that TLS regulatory activities are reduced in the absence of PGC-1 α . A recent report showed that the DNA damage response protein ATM induces mitochondrial biogenesis, and the authors propose that this induction could be mediated by activation of AMPK (15). Interestingly, ATM has been shown to activate TLS (17), and AMPK is known to activate PGC-1 α (25).

Oxidative stress and DNA damage responses are regulated by the cellular metabolic status

Findings in organisms ranging from yeast to mammals indicate that poor DNA damage responses and increased oxidative stress are prevalent in situations where β -oxidation is significantly reduced (12, 47). For example, in *Saccharomyces cerevisiae* (2), *Schizosaccharomyces pombe* (60), and *Caenorhabditis elegans* (38), starvation triggers both β -oxidation and resistance to DNA damage; in mammals, caloric restriction increases the activity of proteins like SirT1 that are known to increase genome stability (18). However, the molecular circuits that link these two functions have remained obscure. Our results are thus the first to identify the interaction and functional dependence of two factors that are key modulators of these regulatory networks.

Other important transcription factors implicated in the regulation of DNA damage and metabolic responses include p53 (32, 45) and the sirtuins (particularly SirT1) (14), both of which are activated by oxidative stress (31, 42) and have been linked to oxidative stress protection (23, 26). Both PGC-1 α and TLS share functions with p53 and sirtuins. For example, both SirT1 and p53 are, like TLS, recruited to sites of DNA damage (1, 36). Direct p53-TLS interaction has not been reported, but p53 overexpression has been identified as a predictor of poor prognosis in myxoid liposarcoma characterized by the presence of the TLS-C/EBP homologous protein oncogenic fusion, suggesting a possible functional connection (4). SirT1 interacts with and deacetylates PGC-1 α , regulating its activity (35). Further, p53 knockout mice have reduced numbers of mitochondria and lowered PGC-1 α expression, suggesting a positive role for p53 in the regulation of PGC-1 α activity or expression (46).

The newly found link between TLS and PGC-1 α is therefore an important new contribution to the notion that a variety of stress and metabolic signals converge to activate cell survival or apoptosis. To what extent these responses are activated and what determines the choice between survival and apoptosis are currently intense areas of research.

Materials and Methods

Cell culture

Wild-type (TLS^{+/+}) and TLS^{-/-} MEFs were kindly donated by Dr David Ron (NYU, USA). TLS^{+/+} and TLS^{-/-} MEFs were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Primary hepatocytes were isolated and cultured as previously described (6, 44). Briefly, the liver of anesthetized mice was first perfused with perfusion buffer (150 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7.5, 25 mM NaHCO₃, and 0.5 mM EGTA) and then with 0.05% collagenase for 10 min. Dispersed cells were seeded onto collagen-coated plates (0.2% gelatin, 1% collagen) and cultured in Williams E Medium (Gibco) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 nM dexamethasone, 100 nM insulin, and antibiotics. Fresh medium was added 4 h after plating. C57BL6 PGC-1 α ^{-/-} mice were originally provided by Dr. Bruce Spiegelman (DFCI) and following embryonic transfer a colony was established within the SPF area of the CNIC animal facility. Female C57BL6 PGC-1 α ^{+/+} and PGC-1 α ^{-/-} of 8–10 weeks of age were used. The animal experimental protocols were approved by the Institutional

Animal Care and Use Committee of the CNIC. All procedures conformed to the Declaration of Helsinki and the NIH guidelines for animal care and use (NIH publication No. 85-23). The rat hepatoma cell line FAO was grown in RPMI medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, and antibiotics. 293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% FBS and antibiotics.

Yeast two-hybrid screen

A yeast two-hybrid screen was carried out with the Matchmaker Two-Hybrid System (Clontech). The PGC-1 α CTD (aa 561–797) was cloned in the *Eco*R1–*Bam*HI sites of pGBKT7 and used as bait to screen human cDNAs fused to the Gal4 transcriptional activation domain in the GADT7 vector. Thirty-two positive colonies were selected, confirmed, and sequenced. Three clones were found to correspond to the TLS gene.

Adenoviral infections

FAO cells, MEF, and hepatocytes were infected overnight with adenoviral vectors at a moi of 1–50. Viruses were washed off and cells were harvested 24 or 48 h postinfection.

mRNA and protein were analyzed by quantitative PCR of retro transcribed cDNA (qRT-PCR) and WB. The primers and antibodies used were as described (9, 37, 54). Polyclonal α -TLS antibody for WB was from Novus Biologicals. TLS-specific primers for qRT-PCR were forward 5'-CCGATACCTGTCGTCCTGGTC-3' and reverse 5'-CCTCCACCACCGCCACCTCCT-3'.

Immunoprecipitation and ChIP

Preparation of whole-cell extracts and immunoprecipitation (IP) were carried out as described (34). Experimental conditions for ChIP were as previously described (54). TLS was immunoprecipitated with a monoclonal α -TLS antibody (BD Biosciences). Coprecipitated DNA was analyzed by qPCR using primer pairs listed in the Supplementary Data (Supplementary Table S1). Oligos designed against the coding sequence of β -actin were used as negative control.

Luciferase reporter assays

MEF and FAO were transfected with plasmids (Lipofectamine 2000™) for 8 h according to the manufacturer's instructions. Twenty-four hours post-transfection, luciferase activity was determined with the Dual-luciferase® Reporter Assay System (Promega).

GST-pull down assays

Recombinant GST fusion proteins were expressed from pGEX expression vectors in *E. coli* (strain BL21-DE3) and were purified with glutathione agarose (Pharmacia Biotech). Target proteins were labeled with ³⁵S-methionine by *in vitro* transcription/translation using the TNT system (Promega). Labeled proteins were incubated for 1 h at RT with 1 μ g GST fusion protein immobilized on 20 μ l agarose beads in 200 μ l of binding buffer (20 M Tris-HCl [pH 8.0], 10% glycerol, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 2 mM DTT, 0.1%–0.4% NP-40, and 100 mM KCl). Beads were washed three times with 1 ml binding buffer. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

Reactive oxygen species

Cells were labeled with CM-H₂DCFDA. ROS levels were determined by flow cytometry as described (54).

Caspase-3 activity

Fluorimetric quantification of caspase-3 activity was as previously described (54).

Statistics

Data are expressed as means \pm SD. Statistical significance was evaluated by analysis of variance or a nonparametric test, as appropriate. Values were considered statistically significant at $p < 0.05$. $n \geq 3$ in all experiments.

Acknowledgments

We thank Dr. S. Drori for the two-hybrid screen. Dr. D.D. Hickstein for pSG5-FL-TLS, Dr. T. Okamoto for pGEX-TLS, Dr. B. Spiegelman for PGC-1 $\alpha^{-/-}$ mice, Dr. D. Ron for TLS $^{-/-}$ MEFs, and Dr. J. Sastre for careful reading of the article. Editorial support was provided by Dr. S. Bartlett. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grants SAF2006-01619, SAF2009-07599, and CSD 2007-00020 to M.M.; an FPI predoctoral fellowship to C.S.R.; a Juan de la Cierva postdoctoral contract to A.T.) and by the CNIC (CICERONE student fellowship to O.F.). The CNIC is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the Pro-CNIC Foundation.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Al Rashid ST, Delleire G, Cuddihy A, Jalali F, Vaid M, Coackley C, Folkard M, Xu Y, Chen BP, Chen DJ, Lilge L, Prise KM, Bazett Jones DP, and Bristow RG. Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks *in vivo*. *Cancer Res* 65: 10810–10821, 2005.
- Albers E, Larsson C, Andlid T, Walsh MC, and Gustafsson L. Effect of nutrient starvation on the cellular composition and metabolic capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 73: 4839–4848, 2007.
- Alliegro MC and Alliegro MA. A nuclear protein regulated during the transition from active to quiescent phenotype in cultured endothelial cells. *Dev Biol* 174: 288–297, 1996.
- Antonescu CR, Tschernyavsky SJ, Decuseara R, Leung DH, Woodruff JM, Brennan MF, Bridge JA, Neff JR, Goldblum JR, and Ladanyi M. Prognostic impact of P53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: a molecular and clinicopathologic study of 82 cases. *Clin Cancer Res* 7: 3977–3987, 2001.
- Baechtold H, Kuroda M, Sok J, Ron D, Lopez BS, and Akhmedov AT. Human 75-kDa DNA-pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation. *J Biol Chem* 274: 34337–34342, 1999.
- Bahjat FR, Dharnidharka VR, Fukuzuka K, Morel L, Crawford JM, Clare-Salzler MJ, and Moldawer LL. Reduced susceptibility of nonobese diabetic mice to TNF- α and D-galactosamine-mediated hepatocellular apoptosis and lethality. *J Immunol* 165: 6559–6567, 2000.
- Bertolotti A, Bell B, and Tora L. The N-terminal domain of human TAFII68 displays transactivation and oncogenic properties. *Oncogene* 18: 8000–8010, 1999.
- Bertrand P, Akhmedov AT, Delacote F, Durrbach A, and Lopez BS. Human POMp75 is identified as the pro-oncoprotein TLS/FUS: both POMp75 and POMp100 DNA homologous pairing activities are associated to cell proliferation. *Oncogene* 18: 4515–4521, 1999.
- Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, and Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 α . *FASEB J* 20: 1889–1891, 2006.
- Bouvet P, Diaz JJ, Kindbeiter K, Madjar JJ, and Amalric F. Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J Biol Chem* 273: 19025–19029, 1998.
- Burd CG and Dreyfuss G. RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO J* 13: 1197–1204, 1994.
- Burhans WC and Heintz NH. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med* 47: 1282–1293, 2009.
- Cartegni L, Maconi M, Morandi E, Cobianchi F, Riva S, and Biamonti G. hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins. *J Mol Biol* 259: 337–348, 1996.
- Finkel T, Deng CX, and Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 460: 587–591, 2009.
- Fu X, Wan S, Lyu YL, Liu LF, and Qi H. Etosiposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PLoS One* 3: e2009, 2008.
- Fujii R and Takumi T. TLS facilitates transport of mRNA encoding an actin-stabilizing protein to dendritic spines. *J Cell Sci* 118: 5755–5765, 2005.
- Gardiner M, Toth R, Vandermoere F, Morrice NA, and Rouse J. Identification and characterization of FUS/TLS as a new target of ATM. *Biochem J* 415: 297–307, 2008.
- Ghosh HS. The anti-aging, metabolism potential of SIRT1. *Curr Opin Investig Drugs* 9: 1095–1102, 2008.
- Hallier M, Lerga A, Barnache S, Tavittian A, and Moreau-Gachelin F. The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem* 273: 4838–4842, 1998.
- Handschin C. The biology of PGC-1 α and its therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci* 30: 322–329, 2009.
- Hicks GG, Singh N, Nashabi A, Mai S, Bozek G, Klewes L, Arapovic D, White EK, Koury MJ, Oltz EM, Van Kaer L, and Ruley HE. Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death. *Nat Genet* 24: 175–179, 2000.
- Horvathova E, Eckl PM, Bresgen N, and Slamenova D. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of H₂O₂ and DMNQ on freshly isolated rat hepatocytes; protective effects of carboxymethyl chitin-glucan. *Neuro Endocrinol Lett* 29: 644–648, 2008.
- Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta S, Mechanic L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, and Harris CC. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res* 64: 2350–2356, 2004.
- Iko Y, Kodama TS, Kasai N, Oyama T, Morita EH, Muto T, Okumura M, Fujii R, Takumi T, Tate S, and Morikawa K.

- Domain architectures and characterization of an RNA-binding protein, TLS. *J Biol Chem* 279: 44834–44840, 2004.
25. Jager S, Handschin C, St-Pierre J, and Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12017–12022, 2007.
 26. Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, and Motoyama N. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* 16: 237–243, 2005.
 27. Kuroda M, Sok J, Webb L, Baechtold H, Urano F, Yin Y, Chung P, de Rooij DG, Akhmedov A, Ashley T, and Ron D. Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(-/-) mice. *EMBO J* 19: 453–462, 2000.
 28. Law WJ, Cann KL, and Hicks GG. TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5: 8–14, 2006.
 29. Lerga A, Hallier M, Delva L, Orvain C, Gallais I, Marie J, and Moreau-Gachelin F. Identification of an RNA binding specificity for the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem* 276: 6807–6816, 2001.
 30. Li X, Monks B, Ge Q, and Birnbaum MJ. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 α transcription coactivator. *Nature* 447: 1012–1016, 2007.
 31. Lotem J, Peled-Kamar M, Groner Y, and Sachs L. Cellular oxidative stress and the control of apoptosis by wild-type p53, cytotoxic compounds, and cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9166–9171, 1996.
 32. Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer* 9: 714–723, 2009.
 33. Meissner M, Lopato S, Gotzmann J, Sauer mann G, and Barta A. Proto-oncoprotein TLS/FUS is associated to the nuclear matrix and complexed with splicing factors PTB, SRm160, and SR proteins. *Exp Cell Res* 283: 184–195, 2003.
 34. Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, and Spiegelman BM. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell* 6: 307–316, 2000.
 35. Nemoto S, Fergusson MM, and Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α . *J Biol Chem* 280: 16456–16460, 2005.
 36. Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, Hartlerode A, Stegmuller J, Hafner A, Loerch P, Wright SM, Mills KD, Bonni A, Yankner BA, Scully R, Prolla TA, Alt FW, and Sinclair DA. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135: 907–918, 2008.
 37. Olmos Y, Valle I, Borniquel S, Tierrez A, Soria E, Lamas S, and Monsalve M. Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1 α in the induction of oxidative stress genes. *J Biol Chem* 284: 14476–14484, 2009.
 38. Panowski SH and Dillin A. Signals of youth: endocrine regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Endocrinol Metab* 20: 259–264, 2009.
 39. Perrotti D, Bonatti S, Trotta R, Martinez R, Skorski T, Salomoni P, Grassilli E, Luzzo RV, Cooper DR, and Calabretta B. TLS/FUS, a pro-oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *EMBO J* 17: 4442–4455, 1998.
 40. Pessayre D, Mansouri A, Berson A, and Fromenty B. Mitochondrial involvement in drug-induced liver injury. *Handb Exp Pharmacol*: 311–365, 2010.
 41. Powers CA, Mathur M, Raaka BM, Ron D, and Samuels HH. TLS (translocated-in-liposarcoma) is a high-affinity interactor for steroid, thyroid hormone, and retinoid receptors. *Mol Endocrinol* 12: 4–18, 1998.
 42. Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, Baumgart J, Schroter F, Ninnemann O, Siegert E, Bendix I, Brustle O, Nitsch R, Zipp F, and Aktas O. Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol* 10: 385–394, 2008.
 43. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, and Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature* 423: 550–555, 2003.
 44. Rana B, Mischoulon D, Xie Y, Bucher NL, and Farmer SR. Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: reciprocal expression of C/EBP α and immediate-early growth response transcription factors. *Mol Cell Biol* 14: 5858–5869, 1994.
 45. Sahin E and Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 464: 520–528, 2010.
 46. Saleem A, Adhihetty PJ, and Hood DA. Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol Genomics* 37: 58–66, 2009.
 47. Seyfried TN and Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)* 7: 7, 2010.
 48. Shin DJ, Campos JA, Gil G, and Osborne TF. PGC-1 α activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 278: 50047–50052, 2003.
 49. Simbula G, Columbano A, Ledda-Columbano GM, Sanna L, Deidda M, Diana A, and Pibiri M. Increased ROS generation and p53 activation in α -lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. *Apoptosis* 12: 113–123, 2007.
 50. Speckmann B, Walter PL, Alili L, Reinehr R, Sies H, Klotz LO, and Steinbrenner H. Selenoprotein P expression is controlled through interaction of the coactivator PGC-1 α with FoxO1a and hepatocyte nuclear factor 4 α transcription factors. *Hepatology* 48: 1998–2006, 2008.
 51. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, and Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127: 397–408, 2006.
 52. Tan AY and Manley JL. The TET family of proteins: functions and roles in disease. *J Mol Cell Biol* 1: 82–92, 2009.
 53. Uranishi H, Tetsuka T, Yamashita M, Asamitsu K, Shimizu M, Itoh M, and Okamoto T. Involvement of the pro-oncoprotein TLS (translocated in liposarcoma) in nuclear factor-kappa B p65-mediated transcription as a coactivator. *J Biol Chem* 276: 13395–13401, 2001.
 54. Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, and Monsalve M. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 66: 562–573, 2005.
 55. Vousden KH and Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* 9: 691–700, 2009.
 56. Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, Tempst P, Rosenfeld MG, Glass CK, and Kurokawa R. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* 454: 126–130, 2008.
 57. Wu D and Cederbaum AI. Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 29: 141–154, 2009.
 58. Yang L, Embree LJ, Tsai S, and Hickstein DD. Oncoprotein TLS interacts with serine-arginine proteins involved in RNA splicing. *J Biol Chem* 273: 27761–27764, 1998.

59. Zinszner H, Albalat R, and Ron D. A novel effector domain from the RNA-binding protein TLS or EWS is required for oncogenic transformation by CHOP. *Genes Dev* 8: 2513–2526, 1994.
60. Zuin A, Carmona M, Morales-Ivorra I, Gabrielli N, Vivancos AP, Ayte J, and Hidalgo E. Lifespan extension by calorie restriction relies on the Sty1 MAP kinase stress pathway. *EMBO J* 29: 981–991.

Address correspondence to:

Dr. María Monsalve

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares

Melchor Fernández Almagro 3, Room S2

Madrid 28029

Spain

E-mail: mmonsalve@cnic.es

Date of first submission to ARS Central, September 14, 2010; date of final revised submission, February 14, 2011; date of acceptance, February 19, 2011.

Abbreviations Used

Ad = adenovirus
 Ad-P = recombinant adenovirus encoding PGC-1 α
 Ad-T = recombinant adenovirus encoding TLS
 ATM = ataxia telangiectasia mutated
 ATPase β = ATP synthetase β subunit
 ChIP = chromatin immunoprecipitation
 CM-H₂DCFDA = 5-chloromethyl-2' 7'-dichloro-
 hydrofluorescein diacetate acetyl ester

CTD = C-terminal domain
 DCF = 5-chloromethyl-2'7'-dichlorodihydro
 fluorescein diacetate acetyl ester
 ETC = electron transport chain
 FBS = fetal bovine serum
 GST = glutathione-S-transferase
 IP = immunoprecipitation
 MEFs = mouse embryonic fibroblasts
 MnSOD = Mn superoxide dismutase
 moi = multiplicity of infection
 NRF1 = nuclear respiratory factor 1
 NTD = N-terminal domain
 PGC-1 α = peroxisome proliferator activated receptor
 γ -coactivator 1 α
 Prx3, Prx5 = peroxiredoxins 3 and 5
 PI = propidium iodide
 qRT-PCR = quantitative PCR of retro transcribed
 cDNA
 RBD = RNA-binding domain
 RGG = protein domain rich in Arg-Gly-Gly
 triplets
 ROS = reactive oxygen species
 RRM = RNA recognition motif
 shRNA = small hairpin RNA
 shTLS = TLS-specific shRNA
 siRNA = small interference RNA
 SR = Protein domain rich in Ser and Arg
 TLS = translocated in liposarcoma
 TR2 = thioredoxin reductase 2
 Trx2 = Thioredoxin 2
 UAS = Gal4 binding site
 UCP-2 = uncoupling protein 2
 WB = Western blotting

